

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

**VALIDACIÓN DE PROTOCOLO DE PCR MULTIPLEX CON MICROSATÉLITES
PARA MELINA (*Gmelina arborea* Roxb.)**

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL
CON ÉNFASIS EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIATURA

BEATRIZ GARCÍA VALENCIANO

CARTAGO, COSTA RICA

NOVIEMBRE 2024



TEC | Tecnológico
de Costa Rica

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

**VALIDACIÓN DE PROTOCOLO DE PCR MULTIPLEX CON MICROSATÉLITES
PARA MELINA (*Gmelina arborea* Roxb.)**

PROYECTO DE TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL
CON ÉNFASIS EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO
ACADÉMICO DE LICENCIATURA

BEATRIZ GARCÍA VALENCIANO

CARTAGO, COSTA RICA

NOVIEMBRE 2024

Validación de protocolo de PCR multiplex con microsatélites para melina (*Gmelina arborea* Roxb.).

Beatriz García Valenciano ¹

RESUMEN

Gmelina arborea Roxb. (melina) es la segunda especie más utilizada en reforestación en Costa Rica y parte del programa de mejoramiento genético de la cooperativa internacional de mejoramiento genético forestal GENFORES. Se requiere adoptar y mejorar herramientas biotecnológicas que garanticen la identidad del material clonal con el que trabajan. Con melina no existe un protocolo verificado de PCR multiplex con microsatélites que permita caracterizar una población, por lo que esta investigación tiene como objetivo validar el protocolo con marcadores moleculares SSR con base en una colección de 100 genotipos de melina de GENFORES. El ADN fue extraído mediante el método CTAB, amplificado con el PCR multiplex, donde previamente se había organizado dos grupos de cinco microsatélites cada uno, para finalmente correr y una electroforesis capilar. La información fue analizada mediante el software GenAlEx. El 100% de loci se determinó como polimórficos, se genotipó a todos los individuos y se analizó la diversidad genética por microsatélite. Se registró una heterogeneidad observada y esperada de 0,67 y 0,71 respectivamente, con una tasa de exclusión de PE1=0,999, PE2=0,980 y PE3=0,999. El protocolo de PCR multiplex permite ahorrar tiempo y recursos en la caracterización y genotipado molecular de poblaciones de melina.

Palabras clave: ADN, genotipo, mejoramiento genético, marcadores moleculares, genética forestal.



Esta obra está bajo licencia [CC BY-NC-SA 4.0](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

ABSTRACT

Gmelina arborea Roxb. (melina) is the second most used species in reforestation in Costa Rica and part of the genetic improvement program of the international forest genetic improvement cooperative GENFORES. Therefore, it is necessary to adopt and improve biotechnological tools that guarantee the identity of the clonal material with which they work. With melina there is no verified protocol of multiplex PCR with microsatellites that allows characterizing a population, so this research aims to validate the protocol with SSR molecular markers based on a collection of 100 genotypes of melina from GENFORES. The DNA was extracted by the CTAB method, amplified with multiplex PCR, where two groups of five microsatellites each one had previously been organized, to finally run and capillary electrophoresis. The information was analyzed using the GenAEx software. 100% of loci were determined to be polymorphic, all individuals were genotyped and genetic diversity was analyzed by microsatellite. An observed and expected heterogeneity of 0.67 and 0.71 respectively was recorded, with an exclusion rate of $PE_1=0.999$, $PE_2=0.980$ and $PE_3=0.999$. The multiplex PCR protocol saves time and resources in the characterization and molecular genotyping of melina populations.

Keywords: DNA, genotype, genetic improvement, molecular markers, forest genetics.

¹García Valenciano, B. Validación de protocolo de PRC multiplex con microsatélites para melina (*Gmelina arborea* Roxb.). Tesis de Licenciatura. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica. 2024.

ACREDITACIÓN

Trabajo final de graduación defendido públicamente ante el Tribunal Evaluador, integrado por M.Sc. Dawa Méndez Álvarez, Ph.D. Olman Murillo Gamboa y M.Sc. Emmanuel Araya Valverde como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Ingeniería Forestal en el énfasis de manejo y producción Forestal, del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Dawa Méndez Álvarez M.Sc.
Directora de tesis

Olman Murillo Gamboa Ph.D.
Profesor lector

Emmanuel Araya Valverde M.Sc.
Lector.

Dorian Carvajal Vanegas M.Sc.
Coordinador Trabajos Finales
de Graduación.



Beatriz García Valenciano
Estudiante.

DEDICATORIA

A Dios,
a Nazaret, a Nela y a mi mamá,
a mi familia materna y
a todos aquellos que me han apoyado.

AGRADECIMIENTO

A mi hija, Nazaret, que ha sido un motor para poder seguir adelante tanto en mi vida personal como en mis estudios académicos.

A mi mamá, Carmen, que ha estado con en cada momento de mi vida y me ha apoyado en todo lo que ha podido, entregándome su amor incondicional.

A mi hermana María, que siempre me ha apoyado y cuidado desde siempre, desde que tengo memoria y hemos sido un gran complemento en mi vida.

A mi abuelo, aunque ya no esté junto a mí, siempre se sintió orgulloso de mí y me impulsó a seguir adelante con mis sueños y mis estudios.

A mi familia, Valenciano y Benavides, por su amor y apoyo incondicional durante toda mi vida.

A M.Sc Dawa Mendez, mi tutora, que ha sido un gran ejemplo a seguir, su orientación ha sido fundamental para el desarrollo de mi trabajo, ha sido un honor trabajar con ella y valoro su paciencia y su capacidad para escuchar mis inquietudes.

Al M.Sc. Emmanuel Araya, por transmitirme sus conocimiento y habilidades sobre mi tema de tesis.

Al Dr. Olman Murillo, agradecerle sinceramente por todo el apoyo y aprendizaje que me ha brindado durante estos últimos 3 años, ha sido un gran honor ser su estudiante y poder decir con orgullo que fui su estudiante en esta etapa de mi vida.

A mis compañeros, Mariam, Sebastián, Melannie, Kisha, Sofía y Keisy, que me acompañaron al final de esta etapa y me dieron su apoyo y cariño.

A los miembros docentes y administrativos de la Escuela de Ingeniería Forestal del TEC por ser un gran apoyo cuando pase por situaciones difíciles y a GENFORES especialmente que me permitió trabajar con su material genético y recursos, para realizar este trabajo final de graduación.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ACREDITACIÓN.....	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE GENERAL	VI
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	VIII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	4
2.1. Material vegetal.....	4
2.2. Extracción y Cuantificación del ADN total.	5
2.3. PCR multiplex y electroforesis capilar	7
2.4. Análisis de datos.....	10
3. RESULTADOS.....	11
4. DISCUSIÓN.....	16
5. CONCLUSIONES.....	20
6. RECOMENDACIONES	20
7. REFERENCIAS.....	21
8. ANEXOS	25

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Componentes de la reacción de PCR multiplex 1 para la colección de 100 genotipos de <i>Gmelina arborea</i> de GENFORES en Costa Rica.....	7
Cuadro 2. Componentes de la reacción de PCR multiplex 2 para la colección de 100 genotipos de <i>Gmelina arborea</i> de GENFORES en Costa Rica.....	8
Cuadro 3. Parámetros genéticos de 10 microsatélites validados en la colección de 48 genotipos de <i>Gmelina arborea</i> de GENFORES, Costa Rica.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación del sitio de colecta del material vegetal de <i>Gmelina arborea</i> y lugares donde fue procesado.....	4
Figura 2. Microplaca del espectrofotómetro.	6
Figura 3. Perfil térmico para el PCR multiplex para la colección de 100 genotipos de <i>Gmelina arborea</i> de GENFORES.	9
Figura 4. Coordenadas principales (PCoA) de 48 genotipos únicos de <i>Gmelina arborea</i> por multilocus, programa de mejoramiento genético de GENFORES en Costa Rica. 12	
Figura 5. Frecuencia alélica para la combinación de cinco microsatélites del PCR multiplex 1 de <i>Gmelina arborea</i>	13
Figura 6. Frecuencia alélica para la combinación de cinco microsatélites del PCR multiplex 2 de <i>Gmelina arborea</i>	14

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de ADN de melina en el proceso de extracción y preparación. 25	
Anexo 2. Huella genética del multiplex de melina 1.	28
Anexo 3. Huella genética del multiplex de melina 2.	31
Anexo 4. Genotipos multilocus ordenados con genotipos multilocus coincidentes repetidos enumerados primero	34
Anexo 5. Frecuencias alélicas por microsatélite de los 48 individuos.	37
Anexo 6. La distancia genética de los 48 individuos de GENFORES.	39
Anexo 7. Significado de los acrónimos utilizados.....	40

1. INTRODUCCIÓN

Gmelina arborea Roxb. (melina) es una especie forestal de rápido crecimiento con una variedad de usos [1], lo que ha incentivado un aumento en la cantidad de estudios enfocados a su madera, estructura genética, silvicultura y otros temas asociados al establecimiento en plantación, productividad y comercio. Lo que ha promovido una mayor demanda industrial en relación con otras especies de plantación [2]. La melina es la segunda especie más utilizada en reforestación en Costa Rica [3] y es parte del programa de mejoramiento genético de la cooperativa internacional de mejoramiento genético forestal GENFORES creada por la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica en el año 2002 [4-6] .

GENFORES se crea como un mecanismo de vinculación entre la academia y las empresas u organizaciones del sector privado, cuyo objetivo es la conservación y el mejoramiento de los recursos genéticos forestales [5], [7]. A través de su programa de mejoramiento genético la cooperativa logra garantizar y certificar la calidad y seguridad de uso, del material clonal que se produce y libera comercialmente en campo. GENFORES logró desarrollar más de 15 nuevos microsatélites necesarios para determinar la huella genética de los genotipos élite, y el parentesco dentro de la población de mejoramiento [8].

A nivel mundial se encuentran pocos estudios poblacionales utilizando marcadores moleculares en melina, por ejemplo [9, 10] utilizaron RAPD para determinar la diversidad genética de melina en dos regiones de India. Así mismo [11, 12] utilizaron los marcadores de tipo ISSR para determinar la diversidad genética que había en poblaciones tanto naturales como clonales en India, China, Tailandia. Mientras que Naji et al. [13] realizaron este tipo de estudio para una población clonal en India. Estudios recientes reportan el uso de tecnologías de última generación como los análisis de transcriptómica y secuenciación como el trabajo realizado por [14] donde

identifican los genes relacionados al desarrollo del xilema y metabolismo secundario en melina.

Todo trabajo a nivel molecular, como el genotipado o huella genética de una población, debe fundamentarse en protocolos estandarizados y validados. Donde el primero de ellos es la extracción de ADN. Estos procedimientos fueron creados a finales del siglo XX para estudios en humanos, sin embargo, se han adaptado con modificaciones para trabajar con tejido vegetal [15]. Uno de los métodos más aceptados para obtener ADN vegetal ha sido mediante el bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), el cual desintegra el tejido vegetal fresco para la obtención limpia del material genético [16]. Otros procedimientos de extracción de ADN han sido desarrollados, tales como los “kit” comerciales desarrollados específicamente para tejido vegetal, como el DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) [17]. Así también se han realizado modificaciones al método CTAB que incluyen el uso de otros compuestos como el PVPP [18], según el objetivo de la investigación, los recursos económicos y la especie.

En los programas de mejoramiento genético de especies forestales, tanto para producción como conservación, es conveniente realizar estudios de diversidad genética en la población de trabajo [19, 20]. Con lo cual es esencial emplear diferentes técnicas de extracción de ADN, de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la electroforesis, cuya información pueda ser utilizada para determinar el grado de parentesco entre los individuos de la población, el tamaño de la población (N_e) y, su efecto en el potencial de progreso genético o de conservación efectiva *ex situ*.

Cuando se trabaja con una población clonal es importante mantener una diversidad genética suficiente, para evitar una reducción en la variabilidad genética y algún efecto en la vulnerabilidad ante eventos de cambio climático, tolerancia a enfermedades o de adaptación a ambientes marginales [19, 20]. En ambas circunstancias, conocer la información de diversidad genética de la población permite una mejor toma de decisiones.

La técnica de PCR con microsatélites u otro tipo de marcadores ha sido ampliamente utilizada en el mejoramiento genético de plantas, principalmente cultivos agrícolas [21, 22]. Lo que ha motivado la búsqueda de formas de mejorar la velocidad, eficiencia y costos de empleo de esta técnica. El uso del PCR múltiple o multiplex, como [23] ha sido reportado con tres especies del género *Juglans* para determinar diversidad genética o también reportado en *Picea abies*, donde demuestran que es una técnica útil en análisis del genoma en coníferas [24]. En todo caso, el uso de los protocolos de PCR, sencillo o múltiple, debe ser una metodología validada donde se optimicen los recursos y se garantice resultados confiables [25].

A pesar del amplio uso de la técnica de PCR en diversas especies forestales, en Costa Rica no se ha utilizado ni validado un protocolo de PCR multiplex en ninguna especie maderable. Para el programa de mejoramiento genético de melina en GENFORES, es de vital importancia lograr su estandarización y verificación, donde se garantice la identidad del material genético. Por lo tanto, el objetivo de este estudio fue validar el protocolo de PCR multiplex para el uso comercial de marcadores moleculares SSR, en una colección de 100 genotipos élite de melina (*Gmelina arborea* Roxb.) de uno de los programas de mejoramiento genético de GENFORES.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal

Se utilizó material vegetal proveniente del programa de mejoramiento genético GENFORES, de la colección de genotipos de *G. arborea* ubicada en ambiente controlado en el Campus Tecnológico Local San Carlos del Instituto Tecnológico de Costa Rica (10.367557, -84.512941) (Figura 1), a una altitud de 176 msnm, con una temperatura media anual de 23,9 °C y una precipitación de 2484 mm anuales [26].

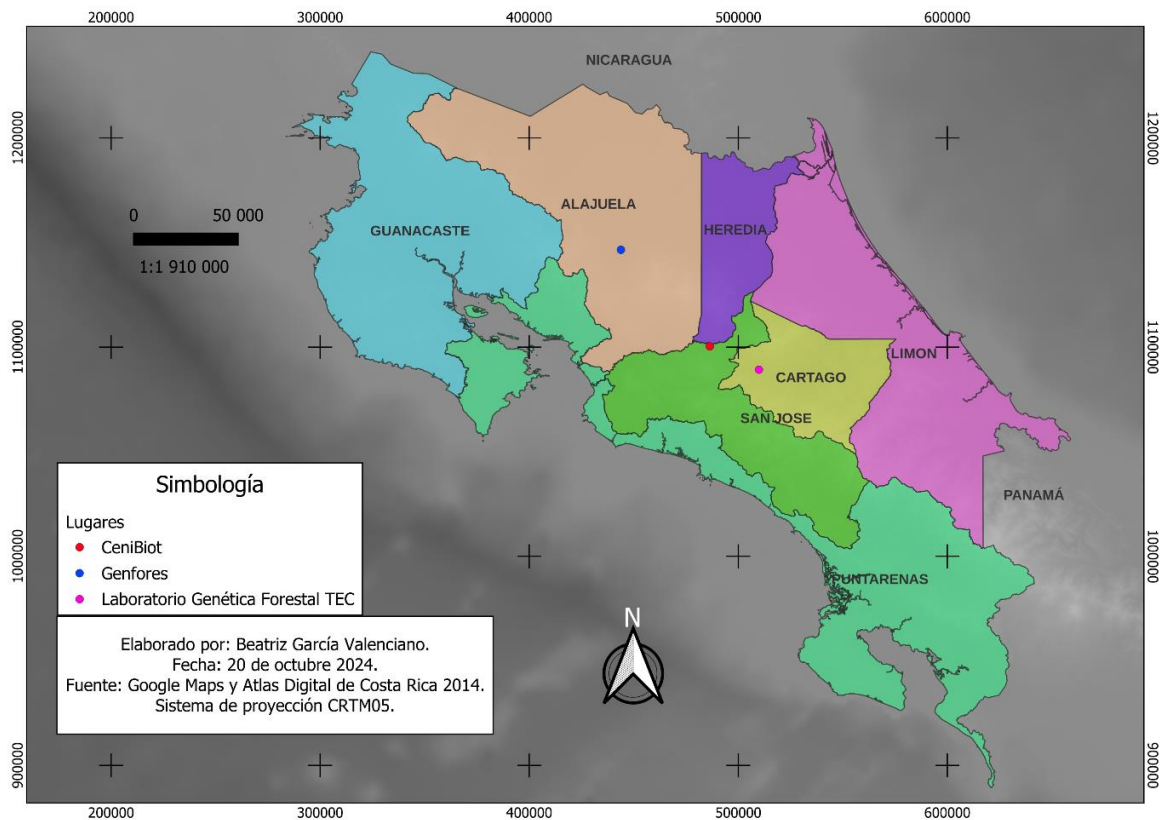


Figura 1. Ubicación del sitio de colecta del material vegetal de *Gmelina arborea* y lugares donde fue procesado.

En los minijardines de GENFORES se cortó con una tijera esterilizada cuatro hojas de dos rametos, por cada clon de los 100 genotipos élite de la colección. Las hojas se colocaron en un sobre de papel con gel de sílica. Posteriormente, las muestras se

trasladaron al laboratorio de Genética Forestal en el Centro de Investigación en Innovación Forestal de la Escuela de Ingeniería Forestal del ITCR en Cartago (Figura 1). En el laboratorio los sobres se incubaron a 75°C por 24 horas para secar completamente el material vegetal para la extracción posterior del ADN.

2.2. Extracción y Cuantificación del ADN total.

Se utilizó el método CTAB [16] con algunas modificaciones para la extracción del ADN total. Para cada genotipo se pesó 50 mg de tejido vegetal seco y se colocó en un tubo de rosca de 2 ml previamente rotulado. Posteriormente, se agregó un balín de 0,1mm y 1000 µl del “buffer” de extracción (100 mM Tris-HCl, 1,4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB) previamente calentado a 65°C. Seguidamente se maceró el tejido en el macerador de modelo FastPrep-24™ 5G (MP Biomedicals LLC), a una velocidad de 6,0 m/s por 15 s y se dejó reposar por unos 5 min. Posteriormente se agregó a cada tubo 10 µl de β-mercaptoetanol al 98% y una punta de espátula de Polivinilpirrolidona (PVP-40). Seguidamente se mezcló con un vórtex (Labnet International, Inc.) y las soluciones se incubaron a 65°C durante 30 minutos, donde cada 10 minutos se agitó por inversión, se gira el tubo boca abajo y de después regresando a su posición inicial. Al terminar el periodo de incubación se transfirió 750 µl de la solución a un tubo de 2 ml estéril, limpio, previamente rotulado, donde se añadió 750 µl de cloroformo-octanol (24:1) y se mezcló por inversión 20 veces.

Se centrifugaron los tubos por 5 min a 14000 rpm, posteriormente se extrajo 500 µl de la fase acuosa y se transfirieron a un tubo de 1,5 ml estéril, previamente rotulado por clon. A cada tubo se le agregó 500 µl de isopropanol a -20°C y se mezcló por inversión. Los tubos se dejaron reposar por 5 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se centrifugaron por 5 min a 14000 rpm y se retiró el sobrante. A cada tubo se le agregó 500 µl de etanol al 70% a -20°C y se desprendió manualmente el botón de ADN.

Se volvió a centrifugar por 2 min a 13000 rpm y al finalizar el centrifugado, se descartó el etanol y se colocaron los tubos en un bloque térmico a 42°C por aproximadamente

20-30 minutos. Posterior al proceso de secado de etanol se resuspendió el botón de ADN en 100 μ l de "buffer" TE con RNasa (1 μ l de RNasa por cada 50 μ l de "buffer" TE). Finalmente, los tubos se incubaron a 37°C por unos 30 min y se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

Se cuantificó el ADN con un espectrofotómetro de microplacas Multiskan SkyHigh (Thermo Scientific), donde las muestras se colocaron en los 32 pozos. La placa está dividida en dos segmentos como se muestra en la Figura 2, cada uno con 16 pozos donde se colocó 1 μ l por muestra y, se dejó en el campo superior izquierdo como blanco. Finalmente se realizó la cuantificación de ADN para cada genotipo y por triplicado (Figura 2).



Figura 2. Microplaca del espectrofotómetro.

Con los resultados de cuantificación se generó una base de datos con 300 valores de pureza (260/280) y concentración (μ g/ml) de los 100 genotipos. Se valoró la concentración y la pureza de cada muestra: si el valor de la muestra fue < a 1,8 en pureza y a 50 μ g/ml en concentración, esta fue descartada y se repitió el proceso de extracción y cuantificación el ADN.

El ADN se visualizó en una electroforesis con un gel de agarosa al 0,8% con “buffer” TAE 1X, se corrió a 70 V y 400 Amp durante 1 hora y 15 min, posteriormente se colocó el gel en el fotodocumentador XR (BioRad) donde se tomaron las fotografías de los geles.

2.3. PCR multiplex y electroforesis capilar

El PCR multiplex se realizó en el laboratorio del Centro Nacional de Alta Tecnología (CENIBIOT) ubicado en el Edificio Dr. Franklin Chang Díaz (sede de CONARE), Pavas, San José (Figura 1).

Se utilizaron 8 marcadores probados para amplificación y polimorfismo utilizando ADN de *G. arborea* por Rocha et al. [8] y se agregó adicionalmente otros dos marcadores, creados por el CENIBIOT a partir de los rangos de amplificación. Bajo las pruebas realizadas se generó dos PCR múltiplex donde cada uno posee 5 pares de marcadores y los cebadores van en direcciones opuestas “F y R”. Se realizó la reacción con un volumen final de 12,5 µl siguiendo los parámetros que se muestran en el Cuadro 1 y Cuadro 2.

Cuadro 1. Componentes de la reacción de PCR multiplex 1 para la colección de 100 genotipos de *Gmelina arborea* de GENFORES en Costa Rica.

Componentes	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para una reacción (µl)
“buffer” de PCR	10x	1x	1,25
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1,25
DNTPs	10 mM	0,8 mM	0,25
BSA	20 mg/mL	0,4 mg/mL	0,25
DMSO		2,00%	0,25
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	2 U/µl	0,2
MELDI1-F	10 µM	0,050 µM	0,065
MELDI1-R	10 µM	0,050 µM	0,065
MELDI11-F	10 µM	0,100 µM	0,125
MELDI11-R	10 µM	0,100 µM	0,125
M8-F	5 µM	0,100 µM	0,25
M8-R	5 µM	0,100 µM	0,25

MELDI2-F	10 µM	0,075 µM	0,095
MELDI2-R	10 µM	0,075 µM	0,095
MELDI7-F	10 µM	0,150 µM	0,19
MELDI7-R	10 µM	0,150 µM	0,19
ADN	~ 40 ng/µl	80 ng	1,5
H ₂ O			6,1
Volumen Final			12,5

Cuadro 2. Componentes de la reacción de PCR multiplex 2 para la colección de 100 genotipos de *Gmelina arborea* de GENFORES en Costa Rica.

Componentes	Concentración Inicial	Concentración Final	Volumen para una reacción (µl)
“buffer” de PCR	10x	1x	1,25
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	1,25
DNTPs	10 mM	0,8 mM	0,25
BSA	20 mg/mL	0,4 mg/mL	0,25
DMSO		2,00%	0,25
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	2 U/µl	0,2
M5-F	5 µM	0,075 µM	0,095
M5-R	5 µM	0,075 µM	0,095
MELDI17-F	10 µM	0,150 µM	0,19
MELDI17-R	10 µM	0,150 µM	0,19
MELDI24-R	10 µM	0,075 µM	0,095
MELDI24-R	10 µM	0,075 µM	0,095
MELDI21-F	10 µM	0,160 µM	0,2
MELDI21-R	10 µM	0,160 µM	0,2
MELDI6-F	10 µM	0,075 µM	0,095
MELDI6-R	10 µM	0,075 µM	0,095
ADN	~ 40 ng/µl	80 ng	1,5
H ₂ O			6,08
Volumen Final			12,5

Se programó el termociclador (Figura 3) para que iniciara la fase de desnaturalización a 95 °C por 5 minutos. Posterior a esto, la fase de alineación cuenta con 35 ciclos, a temperaturas de 95°C por 30 segundos continuando a 55 °C por 30 segundos y a 72 °C durante un minuto, repitiendo el ciclo. La última fase es la de extensión que se

mantiene a 72 °C por 8 minutos, para luego continuar donde el proceso finalizó con una disminución de temperatura que se mantuvo a 4 °C indefinidamente.

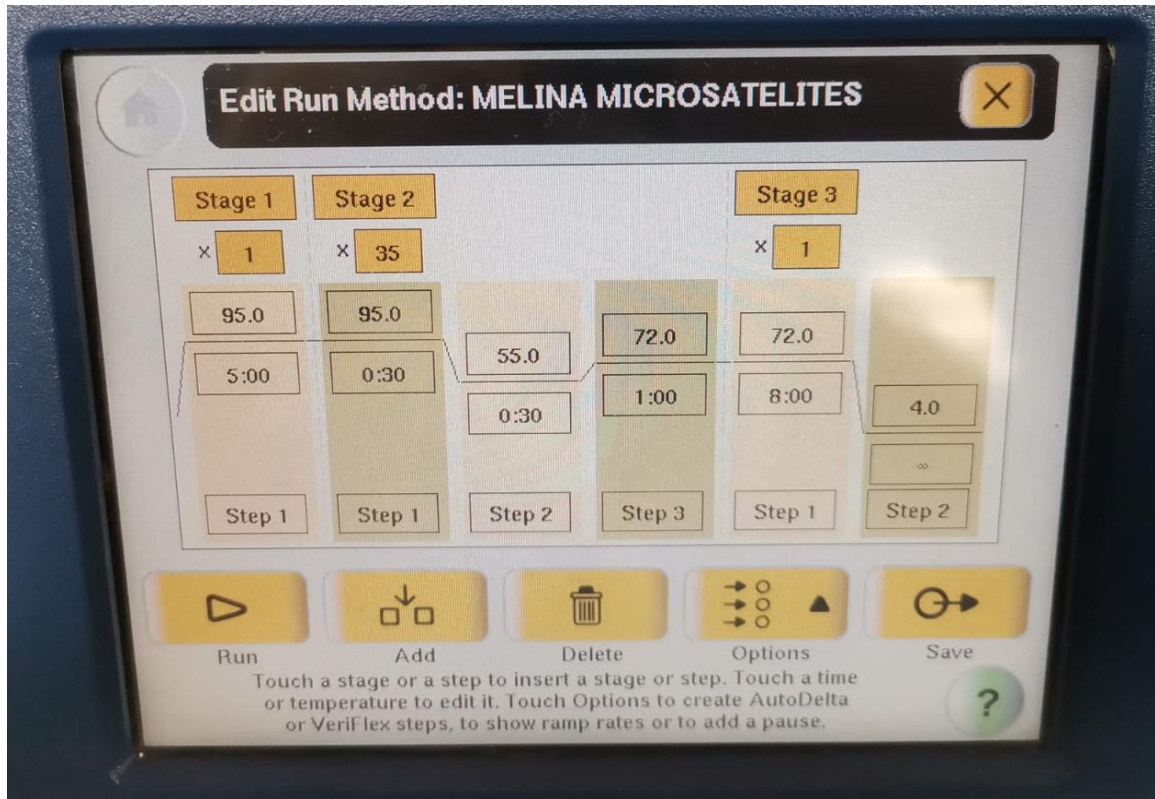


Figura 3. Perfil térmico para el PCR multiplex para la colección de 100 genotipos de *Gmelina arborea* de GENFORES.

Previo a la electroforesis capilar el producto de PCR se diluyó en una relación 1/10 con agua mili Q, se preparó la mezcla de 0,4 µl del LIZ y 8,6 µl de la formamida. Se tomó 1,5 µl del producto diluido y se agregó la mezcla de ambos reactivos para tener un volumen total de 10,5 µl por muestra, posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 2 minutos y se realizó un proceso de desnaturalización a 95°C durante 5 minutos, e inmediatamente se colocó en hielo durante 2 minutos.

La electroforesis capilar se realizó por medio de un servicio externo de análisis en el CENIBIOT, donde los productos de PCR se corrieron en el analizador genético 3500 (Applied Biosystems), en el módulo analizador de fragmentos por 10 segundos. El

tamaño del fragmento se dimensionó mediante la comparación con un estándar de tamaño GeneScan™ 600 LIZ® (Applied Biosystems) y se utilizó “Dye Set” G5 (D5-3).

Con los datos generados se determinó los alelos presentes mediante el uso del software GeneMapper® (Applied Biosystems), las muestras que no amplificaron fueron repetidas desde la PCR multiplex correspondiente y la electroforesis capilar. Como resultado del proceso se elaboró una base de datos con el genotipo de cada individuo.

2.4. Análisis de datos

Los datos de la huella genética se revisaron para asegurar que cada genotipo tuviera un dato real. Seguidamente se organizaron los datos en EXCEL según el formato definido por el software GenAIEx (versión 6.51b2). A partir de la huella genética se realizó el análisis para los individuos que se consideran únicos, donde se determinó la heterocigosidad esperada y observada, frecuencia alélica, número total de alelos, grado de polimorfismo, análisis de exclusión o discriminación de padres, distancia genética y grado de parentesco entre los individuos. Además, se estimó el contenido de información polimórfica en el software Power Marker.

3. RESULTADOS

A partir de la extracción y cuantificación de ADN (Anexo 1) se obtuvo un promedio general de 298 µg/ml para la concentración y de 1,8 para la pureza general.

Dentro del análisis se agrupó los individuos que poseen un mismo genotipo, donde se obtuvo 16 grupos y 32 genotipos únicos. Entre los grupos más grandes con nueve individuos idénticos se incluyen los siguientes genotipos putativos 15N, 4CA, 8CA, 19CA, 20CA, 16PZ, 3PZ, 8PZ y 15PZ. El segundo grupo con nueve individuos idénticos incluyó los códigos 13, 20, 26, 28, 29, 30, 31, 32 y 33 (Anexo 4).

Según el análisis molecular de la colección total se determinó la presencia de 48 genotipos diferentes. De acuerdo con el análisis de exclusión de progenitores con cada microsatélite y para combinaciones crecientes de los 10 microsatélites, se obtuvo una probabilidad de exclusión del 0,999 cuando se conoce al otro progenitor (PE1). Mientras que cuando se desconoce el genotipo de uno de los progenitores (PE2), la tasa de discriminación fue de 0,980. Mientras que cuando se excluye un padre putativo (PE3) se determinó un 0,999 de probabilidad.

De acuerdo con la huella genética se realizó el análisis de las principales coordenadas de los individuos genéticamente diferentes, tal como se muestra en la Figura 4 a los 48 genotipos individuales. Donde se observa una distribución aleatoria en los 4 cuadrantes, exceptuando algunos genotipos que se encuentran cercanos a otros genotipos como es el caso de 54, 63 y 100, ubicados en el cuadrante inferior derecho.

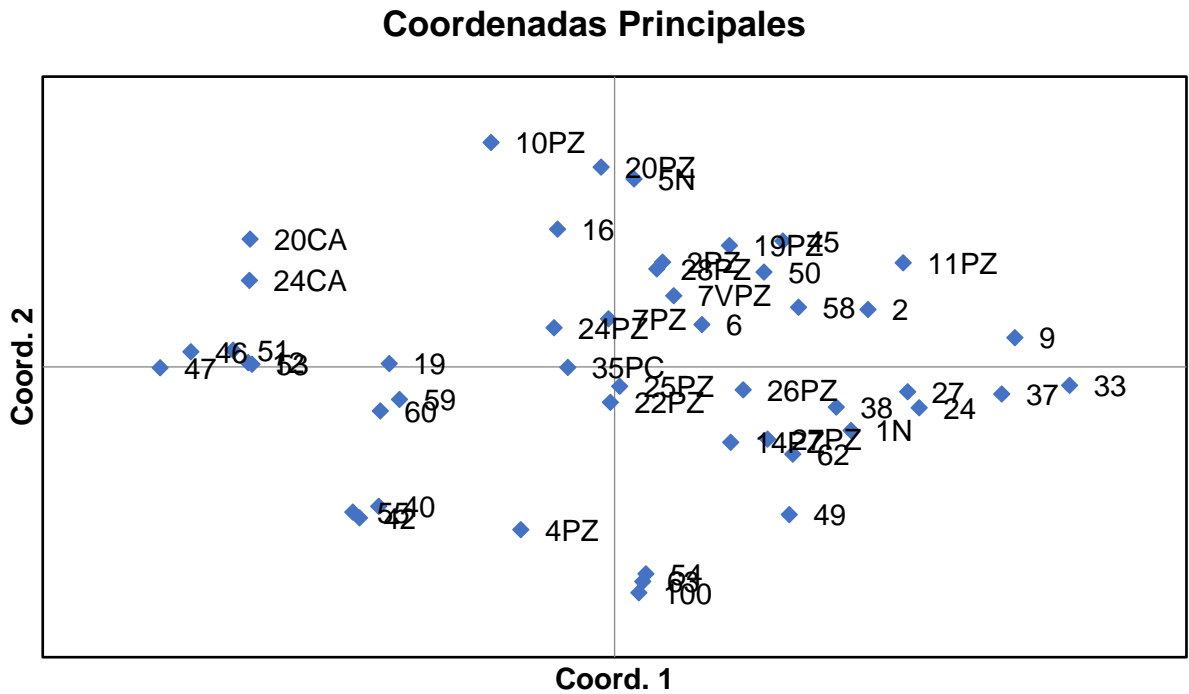


Figura 4. Coordenadas principales (PCoA) de 48 genotipos únicos de *Gmelina arborea* por multilocus, programa de mejoramiento genético de GENFORES en Costa Rica.

De acuerdo con el análisis estadístico se obtuvo un 100% de loci polimórficos (Anexos 2 y 3). La distancia genética se observa en la matriz (Anexo 6), donde el porcentaje de menor distancia genética o proporción de ADN que comparten fue de 30% en el clon 49. Mientras que el clon 10PZ registró el valor más alto con un 46,3% de similitud con el resto de la población. En promedio la población de genotipos de melina registró que comparten un 37% del total de ADN.

Con respecto a la frecuencia alélica del PCR multiplex 1, el microsatélite MELDI11 obtuvo la mayor frecuencia alélica con 0,6, específicamente el alelo 163, mientras que el microsatélite MELDI7 obtuvo la menor frecuencia alélica de 0,01 en los alelos 344 y 356, como se muestra en la Figura 5.

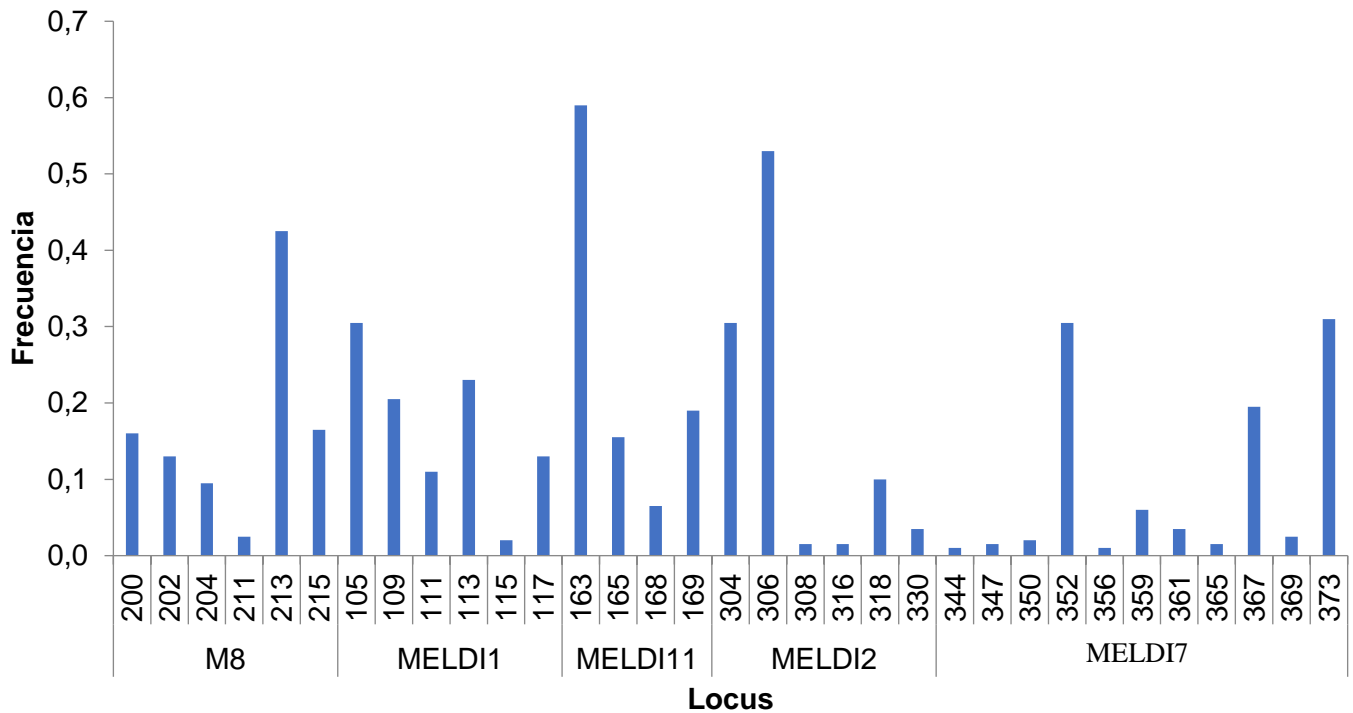


Figura 5. Frecuencia alélica para la combinación de cinco microsatélites del PCR multiplex 1 de *Gmelina arborea*.

Para la frecuencia alélica del PCR multiplex 2, la menor frecuencia alélica fue de 0,005 para los alelos 114 del microsatélite M5 y de los alelos 217 y 229 del microsatélite MELDI24 respectivamente. Mientras que la mayor frecuencia alélica fue de 0,510 para el alelo 299 del microsatélite MELDI6 como se ve en la Figura 6 y también se encuentran en el Anexo 5 las frecuencias alélicas de los microsatélites por alelo.

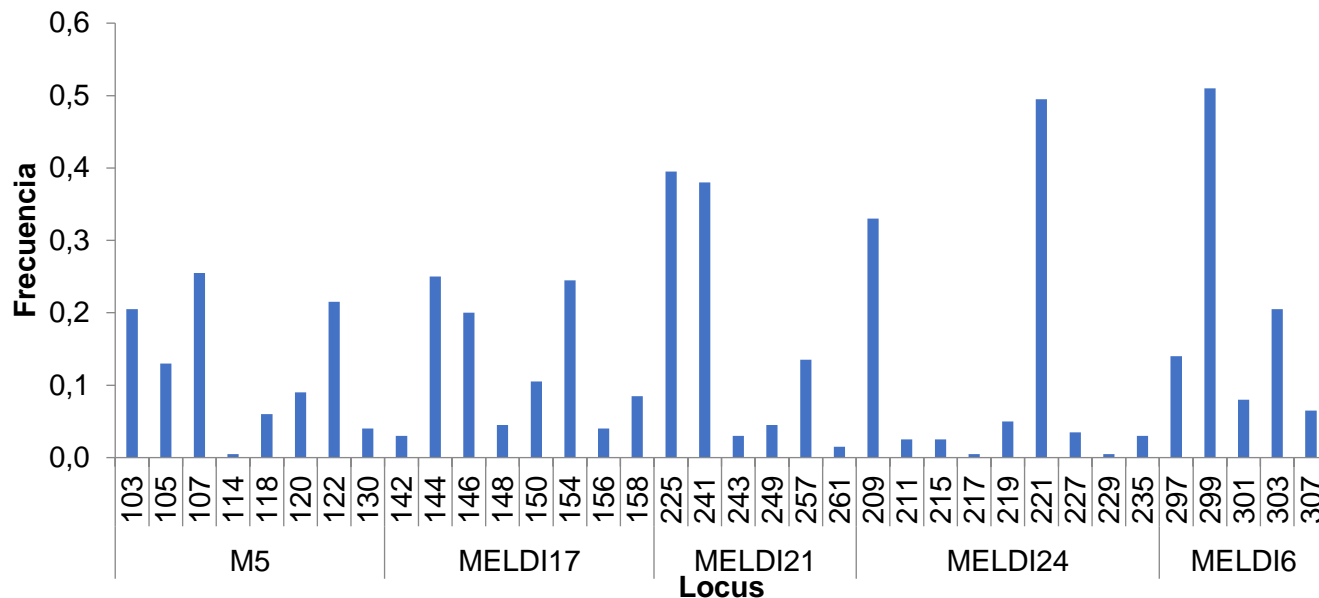


Figura 6. Frecuencia alélica para la combinación de cinco microsatélites del PCR multiplex 2 de *Gmelina arborea*.

Como se observa en el Cuadro 3, según los parámetros genéticos para la colección global de melina se encontró que el número de alelos diferentes (N_a) por locus (microsatélite) fue de 7. Donde el microsatélite MELDI7-apareció con 11 como la mayor cantidad de alelos diferentes. El locus con menor número de alelos fue MELDI11 con 4 alelos.

La heterocigidad observada registró como valor máximo 0,87 en el locus M5, mientras que el valor mínimo de heterocigidad observada fue de 0,54 en el microsatélite MELDI24. Los resultados muestran que los valores de heterocigidad esperada e insesgada esperada, difieren únicamente en los locus MELDI1, MELDI2 y MELDI17, donde el valor máximo fue de 0,82 para el locus M5 y el mínimo fue de 0,59 en el locus MELDI11. Los valores del contenido de información polimórfica oscilaron desde 0,54 hasta 0,79 (Cuadro 3).

Cuadro 3. Parámetros genéticos de 10 microsatélites validados en la colección de 48 genotipos de *Gmelina arborea* de GENFORES, Costa Rica.

Multiplex	Locus	Na	Ne	PIC	Ho	He	uHe	R (pb)	PE1	PE2	PE3	V
1	M8	6	3,85	0,71	0,61	0,74	0,74	200-215	0,53	0,35	0,72	4,14
1	MELDI1	6	4,6	0,75	0,67	0,78	0,79	105-117	0,57	0,39	0,76	4,44
1	MELDI11	4	2,42	0,54	0,56	0,59	0,59	163-169	0,35	0,19	0,52	2,24
1	MELDI2	6	2,59	0,55	0,6	0,61	0,62	304-330	0,36	0,21	0,53	2,34
1	MELDI7	11	4,28	0,73	0,84	0,77	0,77	344-373	0,56	0,38	0,74	5,19
2	M5	8	5,45	0,79	0,87	0,82	0,82	103-130	0,64	0,46	0,81	4,82
2	MELDI17	8	5,4	0,79	0,78	0,81	0,82	142-158	0,64	0,46	0,82	5,55
2	MELDI21	6	3,11	0,62	0,55	0,68	0,68	225-261	0,42	0,26	0,6	3,24
2	MELDI24	9	2,78	0,58	0,54	0,64	0,64	209-235	0,39	0,23	0,57	3,04
2	MELDI6	5	3,01	0,63	0,72	0,67	0,67	297-307	0,44	0,26	0,63	2,7
	Promedio	7	3,75	0,67	0,67	0,71	0,71	103-373	0,49	0,32	0,67	3,77

Número de alelos (Na). Alelos efectivos (Ne). Contenido de información polimórfica (PIC). Heterocigosidad observada (Ho). Heterocigosidad esperada (He). Heterocigosidad insesgada esperada (uHe). Rango de alelos en pares de bases (R). PE poder de exclusión (discriminación) cuando se conocen los genotipos de ambos padres (PE1). PE cuando se conocen los genotipos de un solo padre (PE2). PE al excluir a dos padres putativos (PE3). Diversidad genética (V).

4. DISCUSIÓN

Es importante destacar que la cantidad y la calidad de extracción de ADN es fundamental para este tipo de trabajos. Según [27] los resultados obtenidos se categorizan como una extracción de ADN de alta calidad y se encuentran dentro los valores óptimos para realizar un PCR. Otros estudios en poblaciones de melina obtuvieron un promedio general de pureza de 1,65 y una concentración general de 308,91 µg/ml [28], valores similares a los resultados obtenidos en esta investigación.

Este estudio determinó la huella genética de la colección del programa de mejoramiento genético de melina de GENFORES logrando identificar la presencia de material genéticamente diferente. Se han realizado estudios similares en otras especies forestales como *Quercus chrysolepis* en una población natural y clonal en sur de California, Estados Unidos [29] y, en otra investigación con *Tectona grandis* para genotipos pertenecientes a GENFORES, donde lograron determinar la cantidad de clones únicos [30].

La dispersión que se observó en el análisis de similaridad realizado por coordenadas principales (Figura 4), los individuos se distribuyeron sin un patrón definido, de manera amplia por toda la figura. Mientras que los genotipos idénticos se superpusieron unos sobre otros, y podrían relacionarse con su proximidad geográfica u origen del material [11]. En el caso de una población clonal como la del estudio, debe tomarse en cuenta el proceso de producción de las plantas muestreadas en los jardines clonales. La cantidad alta de individuos registrados con un mismo genotipo podría atribuirse a algún error en el procedimiento de la toma de muestras en el invernadero. Donde pudo ocurrir algún error humano en la codificación de las muestras o podría deberse a que los genotipos compartan una procedencia común, debido a que la melina fue introducida a Costa Rica y ese material distribuirse en el país.

Uno de los beneficios de la PCR multiplex con imprimadores fluoromarcados es la obtención de un resultado más preciso, a un menor costo y más rápido por realizarse

en un análisis simultáneo de múltiples marcadores [25]. Para la colección de 100 genotipos se realizó—solamente 200 reacciones de PCR en lugar de hacer 1000 reacciones, se hicieron 100 reacciones para el Multiplex 1 y 100 reacciones para el multiplex 2, con lo que se economizó el recurso y el tiempo de un total de 800 reacciones, por lo que este protocolo es práctico y factible para este tipo de estudios.

La huella genética de la colección completa del programa de mejoramiento genético GENFORES generó la información necesaria para validar si el protocolo de PCR multiplex funciona adecuadamente, donde los datos se corroboran con los estadísticos de análisis de exclusión de padres, ya que este parámetro “tiene la capacidad de excluir un falso padre tomado al azar” [31].

Resultados similares se observaron en *Pieris amamioshimensis* con 11 marcadores microsatélites donde presentaron una probabilidad de exclusiones de PE1= 0,9565, PE2 = 0,9969 y PE3 = 0,9999 [32], y en caso de la probabilidad de exclusión que se obtuvieron fue de PE1=0,999, PE2= 0,980 y el PE3= 0,999. Por lo tanto, el presente trabajo si tiene una alta relación parental y la probabilidad de exclusión es el nivel de significancia de los datos, por lo que el nivel de confianza de este análisis es el apropiado.

Al saber que hay individuos de la colección de GENFORES que se relacionan entre ellos, se analizó la diversidad genética del conjunto de genotipos, donde se evaluó la cantidad total de las características genéticas dentro de la especie [33, 34] por lo que es importante tener en cuenta que la diversidad tiende a disminuir cuando la población o individuos disminuyen [35]. Finkeldey [36] determino la diversidad genética con las frecuencias alélicas y en el caso de esta investigación la heterogeneidad genética es alta.

El marcador M5 fue el que registró mayor diversidad en comparación con los demás microsatélites con un valor de 4,82 y de manera esperada fue el que tuvo los parámetros más altos en todos los evaluados (Cuadro 3). Meldi11 fue el marcador que

exhibió la menor diversidad genética con 2,24, están aproximados al valor medio que fue de 3,77.

En el análisis de la distancia genética (Anexo 6) los valores menores indican que dos individuos son menos similares genéticamente, de lo que se esperaría al azar en una población [37], Murillo *et al.* [38] menciona que los individuos podrían ser medios hermanos, hermanos completos, primos, lo cual explicaría que se haya registrado una tasa tan alta para el promedio de consanguineidad con 37%. Este estadístico es importante para saber cuánto ADN o información genética comparten los individuos de una población o entre individuos [34].

La tasa tan alta de parentesco puede estar explicada por el origen de la colección de árboles plus de GENFORES. Estos árboles fueron seleccionados en plantaciones comerciales establecidas en distintas regiones del país, Sin embargo, en su mayoría provinieron de las primeras fuentes semilleras desarrolladas en Hojancha a mediados de los años 80 [39-41]. De donde se convirtieron en la base de producción de plantas en los viveros comerciales de la época, que permitieron el establecimiento de la mayoría de las plantaciones con melina en el país.

Según [42, 43] la medida de la frecuencia de un alelo con respecto a todos los alelos de la población y su rango de valores va de 0 a 1, en este estudio la mayor frecuencia fue de 0,6 lo que indica que el alelo está presente en un 60% de la población y la menor frecuencia alélica fue de 0,005 donde indica que es un alelo poco común en los genotipos estudiados. En este trabajo hay un 100% de locis polimórficos, lo cual indica que la variabilidad genética de los individuos que hay en esta población son genéticamente diversos. En otras investigaciones de melina en Asia, específicamente India y alrededores, se obtuvo que los locis tenían un 88% y 100% de polimorfismo [13, 11], similar a lo reportado en el estudio.

La heterocigosidad esperada es el número de heterocigotos esperado teniendo en cuenta las frecuencias alélicas, establece la probabilidad de que, en un único locus,

un par de alelos escogidos al azar sean diferentes entre sí; cuando se considera la H_e promedio de todos los loci se puede observar el grado de variabilidad genética de una población en un rango de 0 a 1 [44, 43]. En otros estudios en melina del sur y sureste de Asia, específicamente de India, China, Tailandia y Myanmar, obtuvieron una heterocigosidad esperada fue de 0,83 [11], similar a la reportada en este trabajo ($H_e = 0,71$).

La heterocigosidad observada se calcula para cada locus, donde el número de heterocigotos está determinado por la cuenta directa y el número de muestras, su rango de valores va de 0 a 1 [44, 43]. En estudios de microsatélites establecieron la heterocigosidad, como fue el caso de *Prosopis alba*, donde la H_o fue de 0,445 [45]. Y para melina se han encontrado valores de $H_o = 0,56$ [11] y en este trabajo la heterocigosidad observada fue de 0,67.

5. CONCLUSIONES

Se validó el protocolo de PCR multiplex para el uso comercial de marcadores moleculares, de la colección de melina (*Gmelina arborea* Roxb.) de GENFORES, para garantizar su reproducibilidad, ahorrar tiempo y recursos.

El protocolo de PCR multiplex determinó que GENFORES posee realmente un total de 48 genotipos e indican que valores genéticos realizados en la investigación demuestran el alto valor de diversidad genética que hay en la colección.

6. RECOMENDACIONES

- Continuar con la comprobación de pureza en los lotes monoclonales que mantiene la cooperativa en ambiente controlado.
- Realizar protocolos de verificación de la huella genética en las accesiones que resultaron con misma identidad genética.
- Traer material externo al país y verificar que no sean los mismos genotipos que posee la cooperativa, para aumentar la diversidad genética del programa de mejoramiento genético de melina.

7. REFERENCIAS

- [1] S. Olaniran y H. Militz, "Estabilidad dimensional y propiedades mecánicas de *Gmelina arborea* Roxb. Madera modificada térmicamente mediante sistemas de reactor abierto y reactor cerrado de baja presión," *Forests*, vol. 15, no. 3, 2024.
- [2] C. Tenorio, R. Moya, M. Saenz, A. Navarro, M. Carranza y V. Paniagua, "Diseño, resistencia, tablas de diseño, propuesta de empaque y manuales de uso de cerchas construidas con madera de *Gmelina arborea* e *Hieronyma alchorneoides* de plantaciones forestales en Costa Rica," *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 14, no. 35, 2017.
- [3] W. Hernández, O. Murillo y Y. Badilla, "Selección temprana en ensayos clonales de melina (*Gmelina arborea* Robx.) en Costa Rica," *Agronomía Mesoamericana*, vol. 32, no. 1, 4/1, pp. 93–106, 2021. DOI: 10.15517/am.v32i1.42069.
- [4] O. Murillo y Y. Badilla, "Progreso en 15 años de mejoramiento genético en GENFORES y su enfoque estratégico hacia sistemas agroforestales. en: V Congreso Nacional de Sistemas Agroforestales.", Arani, Cochabamba, Bolivia, nov. 17-18, 2017.
- [5] O. Murillo y Y. Badilla, "Impacto de los programas de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis*) en Costa Rica y América Latina." En: XIV CONAFA., San José, Costa Rica, oct. 24-27, 2016.
- [6] O. Murillo. "Developing GENFORES, a tree improvement cooperative based on Small Scale Forestry." In North Carolina State University. Raleigh, NC. USA. 2016.
- [7] O. Murillo. GENFORES. Cooperativa de Conservación y Mejoramiento Genético Forestal. Boletín. Taller de Publicaciones. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 26 pp. Junio, 2024.
- [8] O. Rocha, D. Méndez, F. Rojas y O. Murillo, "Aislamiento y caracterización de quince loci microsatélites para su uso en el mejoramiento de *Gmelina arborea* Roxb. (Lamiáceas)," *Genetic Resources*, vol. 1, no. 2, pp. 23–28, 2020. DOI: 10.46265/genresj.LLTJ1737.
- [9] A. Mayavel, J. Soosairaj, A. Shanthi y A. Nicodemus, "Genetic diversity assessment in selected genetic resources of *Gmelina arborea* Roxb using RAPD markers," *Int J Chem Stud*, vol. 8, no. 6, pp. 697–704, 2020. DOI: <https://doi.org/10.22271/chemi.2020.v8.i6j.10853>.
- [10] S. Madhan, G. Sugumaran, T. Kalaiyarasu y N. Bubna, "A rapid method for isolation of high quality DNA from leaves of *Gmelina arborea* (Roxb) for molecular analysis," *International Journal of Biotechnology Applications*, vol. 1, no. 2, pp. 16–19, 2009.

- [11] A. Wee, C. Li, W. Dvorak y Y. Hong, "Genetic diversity in natural populations of *Gmelina arborea*: implications for breeding and conservation," *New Forests*, vol. 43, no. 1, pp. 411–428, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11056-011-9288-2>.
- [12] D. Naik, D. Singh, V. Vartak, S. Paranjpe y S. Bhargava, "Evaluación de la diversidad morfológica y genética en *Gmelina arborea* Roxb. ," *Boques Nuevos*, vol. 38, pp. 99–115, 2009.
- [13] A. Najji, P. Trivedi, K. Prajapati, M. Panchal y G. Sindhav, "Evaluation of Genetic Diversity in *Gmelina arborea* Roxb. Across Different Regions of Gujarat, India: The First Report," *Plant Molecular Biology Reporter*, vol. 1, 6/19, pp. 1–11, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11105-024-01470-5>.
- [14] M. Yaya, K. Mohan, V. Kumar, L. Dampanaboina, V. Mendu y W. Terán, "De novo transcriptome analysis of white teak (*Gmelina arborea* Roxb) wood reveals critical genes involved in xylem development and secondary metabolism," *BMC Genomics*, vol. 22, no. 494, pp. 22, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07777-x>.
- [15] R. Cruz, "Historia de la genética latinoamericana en el siglo XX," *Revista Médica de Chile*, vol. 127, no. 12, 1999.
- [16] J. Doyle, "Aislamiento de ADN vegetal a partir de tejido fresco," *Enfoque*, vol. 12, no. 1, 1990.
- [17] E. Quiala, L. Valledor, R. Hazbun, R. Barbón, M. de Feria y M. Chávez, "Estandarización de un protocolo de obtención de ADN genómico para la cuantificación de 5mC en brotes epicórmicos de *Tectona grandis* L." *Biotecnología vegetal*, vol. 8, no. 1, 2008.
- [18] A. Angélica, C. Manuel y Q. Roselló, "Extracción de ADN de *Xylella Fastidiosa* de Bacterias Cultivadas y Material Vegetal." *Acta Microscopica*, vol. 29, no. 5, 2020.
- [19] S. Bonnin, L. Faustino, J. Alvarez y C. Graciano, "¿La combinación de clones posee alguna ventaja sobre los sistemas monoclonales? Posibles alternativas silviculturales para las Salicáceas, a partir de la revisión de experiencias previas," *Revista de la Facultad de Agronomía*, vol. 119, no. 2, pp. 051, 2020. DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e051>.
- [20] J. Delgado, M. Rodríguez, E. Testé, A. Bejerano, E. Veltjen, M. de la Cruz, P. Asselman, I. Larridon, M. Samain y L. González, "Estructura y diversidad genética de *Magnolia cubensis* subsp. *cubensis* (Magnoliaceae)," *Revista del Jardín Botánico Nacional*, vol. 43, pp. 33–46, 2022.
- [21] F. Rojas y O. Murillo, "Avance en el uso de marcadores moleculares en la Cooperativa de Mejoramiento Genético Forestal GENFORES,". En: Quinto Congreso Forestal Latinoamericano, Lima, Perú, Oct. 18-21, 2011.

- [22] M. Hayden, T. Nguyen, A. Waterman y K. Chalmers, "Multiplex-ready PCR: a new method for multiplexed SSR and SNP genotyping," *BMC Genomics*, vol. 9, pp. 1–12, 2008.
- [23] Z. Xiahou, M. Wambulwa, Z. Xu, L. Ye, P. Fan, E. Magige, Y. Luo y J. Liu, "A multiplex PCR system of novel microsatellite loci for population genetic application in walnuts," *Plants*, vol. 12, no. 24, pp. 4101, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/plants12244101>.
- [24] G. Paglia y M. Morgante, "PCR-based multiplex DNA fingerprinting techniques for the analysis of conifer genomes," *Molecular breeding*, vol. 4, no. 2, pp. 173–177, 1998. DOI: 10.1023/A:1009637608702.
- [25] A. Bolivar, A. Rojas y P. Lugo, "PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización," *Avances en biomedicina*, vol. 3, no. 1, pp. 25–33, 2014.
- [26] M. Pereira, "Mapa de precipitaciones y temperaturas," Instituto Meteorológico Nacional (IMN), 2024. Disponible: <https://www.imn.ac.cr/web/imn/mapa>.
- [27] H. Souza, L. Muller, R. Brandão y M. Lovato, "Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado," *Genetics and Molecular Research*, vol. 11, no. 1, pp. 756–764, 2012. DOI: <http://dx.doi.org/10.4238/2012.March.22.6>.
- [28] D.J. Tafur, "Estudio de la diversidad genética de la colección de melina (*Gmelina arborea* Roxb) del INIAP, mediante el uso de marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats)." Tesis, Universidad de las Fuerzas Armadas, Sangolquí, Ecuador, 2017.
- [29] A. Montalvo, S. Conard, M. Conkle y P. Hodgskiss, "Population structure, genetic diversity, and clone formation in *Quercus chrysolepis* (Fagaceae)," *American Journal of Botany*, vol. 84, no. 11, pp. 1553–1564, 1997. DOI: <https://doi.org/10.2307/2446617>.
- [30] E. Araya, O. Murillo, G. Aguilar y O. Rocha, "Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal," *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, vol. 2, no. 6, pp. 45–58, 2005.
- [31] T. Fernández, "Optimización de programas de selección en acuicultura", Universidad de Cádiz, España. 2020.
- [32] Y. Mitsui, J. Nagasawa, Y. Maeda y H. Setoguchi, "Characterization of new microsatellite loci in *Pieris amamioshimensis* (Ericaceae), a species nearly extinct in the wild," *Plant Species Biology*, vol. 33, no. 1, pp. 72–76, 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/1442-1984.12193>.

- [33] C. Talamantes, M. Cortés, R. Balois, G. López y Y. Palomino, "Análisis molecular de la diversidad genética en guanábana (*Annona muricata* L.) mediante marcadores SRAP," *Revista fitotecnia mexicana*, vol. 42, no. 3, pp. 209–214, 2019.
- [34] B. Gutiérrez, R. Ipinza y S. Barros, "Conservación de recursos genéticos Forestales Principios y Practicas," ed. 1, Santiago, Chile: Instituto Forestal, 2015.
- [35] M. Vilela de Resende, O. Murillo y Y. Badilla, "Genética cuantitativa y selección en el mejoramiento forestal," *Cartago: Editorial Tecnológica de Costa Rica*, 2018.
- [36] R. Finkeldey y O. Murillo, "Contributions of subpopulations to total gene diversity," *Theoretical and Applied Genetics*, vol. 98, pp. 664–668, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1007/s001220051118>
- [37] M. Lynch y K. Ritland, "Estimation of pairwise relatedness with molecular markers," *Genetics*, vol. 152, no. 4, 8/1, pp. 1753–1766, 1999. DOI: <https://doi.org/10.1093/genetics/152.4.1753>.
- [38] O. Murillo, Y. Badilla, M. Villalobos y F. Rojas, "Optimización de la tecnología de propagación vegetativa in vivo y plantación de teca y pilón." *Vicerrectoría de Investigación y extensión*, TEC. 2013.
- [39] F. Lega. "Estudios de la forma de *Gmelina arborea* (Roxb). Análisis de las plantaciones de Manila." Tesis de MSc. CATIE. Turrialba. CR. 199 p. 1988.
- [40] O. Murillo. "Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica." *Tecnología en Marcha*. **11 (3)**: 51-58 p. 1992.
- [41] M. Barquero. "Establecimiento de Rodales Semilleros de *Gmelina arborea* Roxb." En: Taller Nacional de Semillas y Viveros Forestales (San José, C R.). p 141. 1985.
- [42] R. Frankham, D. Briscoe y J. Ballou, "Introduction to conservation genetics" *Cambridge university press*, Australia. 2002.
- [43] E. Gonzales, J. Hamrick, P. Smouse, D. Trapnell y R. Peakall, "The impact of landscape disturbance on spatial genetic structure in the Guanacaste tree, *Enterolobium cyclocarpum* (Fabaceae)," *Journal of Heredity*, vol. 101, no. 2, 11/27, pp. 133–143, 2009. DOI: <https://doi.org/10.1093/jhered/esp101>.
- [44] A. Hoelzel y G. Dover, "Genetic differentiation between sympatric killer whale populations," *Heredity*, vol. 66, no. 2, 4/1, pp. 191–195, 1991.
- [45] K. LM, M.V. Spoljaric y S. Torales, "Identificación de genotipos estables en 19 familias de *Prosopis alba* usando marcadores de microsatélites y parámetros de productividad," *Quebracho (Santiago del Estero)*, vol. 27, no. 1, pp. 26, 2019.

8. ANEXOS

Anexo 1. Cuantificación de ADN de melina en el proceso de extracción y preparación.

Código extracción TEC	µg/ ml	260/280	µg/ ml	260/280	µg/ ml	260/280	Promedio µg/ ml
1	544	1,75	379	1,77	467	1,76	463,33
2	137	1,5	67,8	1,55	154	1,54	119,6
3	192	1,54	189	1,55	284	1,74	221,67
4	863	1,91	47,6	1,06	397	1,81	435,87
5	263	1,56	321	1,57	255	1,6	279,67
6	621	1,67	661	1,68	413	1,66	565
7	242	1,82	264	1,8	276	1,77	260,67
8	227	1,75	232	1,75	272	1,75	243,67
9	882	1,89	654	1,91	576	1,9	704
10	395	1,77	273	1,81	144	1,68	270,67
11	215	1,77	186	1,8	191	1,8	197,33
12	145	1,82	133	1,83	169	1,58	149
13	248	1,79	273	1,81	144	1,68	221,67
14	999	1,75	186	1,76	807	1,68	664
15	563	1,8	133	1,77	422	1,76	372,67
16	221	1,75	273	1,75	282	1,75	258,67
17	241	1,82	699	1,77	168	1,78	369,33
18	350	1,8	614	1,81	174	1,63	379,33
19	377	1,76	167	1,78	347	1,74	297
20	186	1,7	261	1,69	260	1,71	235,67
21	617	1,83	415	1,77	493	1,78	508,33
22	325	1,78	308	1,8	308	1,78	313,67
23	224	1,79	193	1,78	237	1,78	218
24	125	1,72	514	1,73	137	1,73	258,67
25	276	1,8	320	1,79	240	1,78	278,67
26	632	1,78	197	1,78	531	1,8	453,33
27	291	1,77	137	1,8	356	1,76	261,33
28	464	1,79	275	1,83	446	1,79	395
29	250	1,75	489	1,74	237	1,77	325,33
30	375	1,77	340	1,7	1,39	1,75	238,8
31	239	1,78	493	1,77	171	1,76	301
32	154	1,71	243	1,72	147	1,72	181,33
33	109	1,79	690	1,75	90,3	1,66	296,43
34	170	1,73	164	1,75	126	1,78	153,33
35	77,1	1,74	58,5	1,74	63	1,74	66,2
36	205	1,68	184	1,79	179	1,79	189,33
37	131	1,78	137	1,75	130	1,73	132,67
38	73,8	1,69	57,8	1,66	60,8	1,6	64,13

39	120	1,61	124	1,66	47,1	1,51	97,03
40	74,3	1,75	70,8	1,58	35,3	1,75	60,13
41	306	1,78	303	1,72	297	1,66	302
42	159	1,88	238	1,86	129	1,85	175,33
43	156	1,63	168	1,66	82,6	1,47	135,53
44	128	1,72	32,5	1,54	128	1,72	96,17
45	347	1,89	433	1,87	280	1,7	353,33
46	57,3	1,12	45,4	1,3	50,9	1,34	51,2
47	91,1	1,56	91,2	1,62	79,8	1,51	87,37
48	134	1,53	129	1,53	56,4	1,69	106,47
49	528	1,88	448	1,88	313	1,87	429,67
50	111	1,72	101	1,75	93,3	1,73	101,77
51	130	1,75	145	1,77	133	1,77	136
52	159	1,76	172	1,76	159	1,79	163,33
53	528	1,66	448	1,67	313	1,61	429,67
54	204	1,77	203	1,75	190	1,82	199
55	229	1,79	215	1,75	197	1,76	213,67
56	292	1,74	270	1,78	245	1,81	269
57	340	1,75	326	1,7	216	1,73	294
58	342	1,82	292	1,82	344	1,77	326
59	236	1,79	218	1,82	260	1,76	238
60	106	1,68	110	1,68	96	1,71	104
61	680	1,77	720	1,79	591	1,78	663,67
62	612	1,7	206	1,86	446	1,74	421,33
63	188	1,81	226	1,82	210	1,82	208
64	565	1,82	616	1,81	661	1,71	614
65	230	1,78	242	1,78	243	1,76	238,33
66	222	1,84	194	1,76	178	1,83	198
67	152	1,74	115	1,71	121	1,73	129,33
68	95,8	1,73	125	1,72	94,8	1,71	105,2
69	213	1,78	237	1,77	278	1,71	242,67
70	421	1,74	324	1,79	400	1,75	381,67
71	228	1,77	244	1,78	190	1,8	220,67
72	292	1,84	181	1,55	235	1,78	236
73	237	1,67	264	1,75	222	1,65	241
74	139	1,79	141	1,76	162	1,81	147,33
75	156	1,76	135	1,8	141	1,77	144
76	187	1,81	222	1,85	187	1,76	198,67
77	289	1,77	261	1,78	234	1,77	261,33
78	256	1,84	275	1,81	262	1,79	264,33
79	17,3	1,83	21,5	1,65	32,8	1,53	23,87
80	299	1,75	347	1,79	257	1,8	301
81	349	1,81	195	1,82	259	1,82	267,67
82	163	1,78	150	1,77	131	1,79	148
83	320	1,79	335	1,8	251	1,74	302
84	193	1,78	167	1,78	163	1,79	174,33
85	586	1,84	474	1,82	371	1,84	477

86	308	1,77	428	1,68	313	1,82	349,67
87	366	1,81	345	1,83	364	1,81	358,33
88	496	1,82	481	1,8	475	1,85	484
89	642	1,82	600	1,82	548	1,8	596,67
90	597	1,82	399	1,74	531	1,79	509
91	466	1,78	459	1,78	388	1,64	437,67
92	301	1,72	265	1,58	347	1,81	304,33
93	460	1,77	493	1,7	347	1,74	433,33
94	433	1,72	383	1,73	372	1,72	396
95	250	1,72	264	1,56	310	1,82	274,67
96	457	1,8	551	1,8	541	1,8	516,33
97	327	1,85	375	1,82	328	1,86	343,33
98	320	1,73	482	1,81	439	1,78	413,67
99	301	1,74	360	1,88	373	1,83	344,67
100	300	1,74	330	1,76	427	1,71	352,33

Anexo 2. Huella genética del multiplex de melina 1.

Código extracción TEC	MM1									
	M8		MELDI1		MELDI2		MELDI7		MELDI11	
1	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
2	200	200	109	109	306	306	359	367	163	169
3	213	213	109	111	304	306	367	373	163	165
4	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
5	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
6	204	213	109	109	304	306	367	367	165	169
7	200	200	105	113	306	330	352	367	163	168
8	200	200	105	113	306	330	352	367	163	168
9	211	211	109	109	306	306	352	367	168	169
10	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
11	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
12	204	213	105	117	306	306	352	373	163	163
13	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
14	213	213	105	117	306	318	359	373	163	163
15	204	213	105	117	306	306	352	373	163	163
16	204	215	105	117	304	306	352	367	163	163
17	202	215	105	105	304	306	352	367	165	169
18	204	213	105	117	306	330	350	367	163	163
19	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
20	200	200	105	113	306	330	352	367	163	168
21	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
22	200	215	105	113	306	330	352	367	163	168
23	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
24	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
25	200	200	105	113	306	330	352	367	163	168
26	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
27	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
28	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
29	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
30	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169
31	202	215	109	109	306	306	352	373	165	169

32	202	215	105	105	304	306	352	367	165	169
33	202	213	105	105	306	306	373	373	163	163
34	202	215	105	105	304	306	352	367	165	169
35	204	215	105	105	304	306	359	373	163	169
36	213	213	105	117	306	318	359	373	163	163
37	213	213	105	117	306	318	359	367	163	163
38	213	213	105	117	306	318	359	373	163	163
39	213	213	105	117	306	318	359	373	163	163
40	204	213	105	117	306	306	352	373	163	163
41	213	213	109	111	304	306	367	373	163	165
42	213	215	113	113	304	306	352	373	165	169
43	204	213	105	117	306	306	359	359	163	163
44	213	213	105	117	306	318	359	373	163	163
45	213	213	109	111	304	306	367	373	163	165
46	213	215	105	113	306	306	352	373	163	169
47	213	215	105	113	304	306	352	373	165	169
48	204	213	105	117	306	306	352	373	163	163
49	202	213	105	117	306	306	352	373	163	163
50	202	213	105	111	306	306	373	373	163	163
51	213	213	105	117	306	318	359	359	163	163
52	202	213	105	105	306	306	373	373	163	163
53	213	213	109	111	304	306	367	373	163	165
54	215	215	113	115	306	318	350	356	168	168
55	213	213	109	111	304	306	367	367	163	165
56	213	213	109	111	304	306	367	373	163	165
57	202	213	105	111	304	318	352	367	163	168
58	202	213	105	111	304	318	352	367	163	168
59	202	213	105	105	306	306	347	373	163	163
60	202	213	105	105	306	306	373	373	163	163
61	200	200	113	117	304	308	365	367	163	163
62	200	213	113	113	304	304	367	373	163	169
63	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
64	202	213	105	105	306	306	373	373	163	163
65	200	200	117	117	304	306	369	373	163	168
66	200	200	113	117	304	308	365	367	163	163
67	200	200	113	117	304	308	365	367	163	163
68	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163

69	200	200	117	117	304	306	369	373	163	168
70	211	215	109	113	304	306	369	369	163	169
71	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
72	200	215	105	109	304	306	352	373	163	165
73	213	213	105	111	306	306	352	352	165	169
74	213	213	105	111	306	306	352	352	165	169
75	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
76	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
77	211	211	115	117	306	316	352	356	163	169
78	200	200	115	117	304	316	344	350	163	169
79	202	215	109	111	306	318	352	352	163	169
80	213	213	105	109	306	306	367	373	163	169
81	202	215	109	111	306	318	352	352	163	169
82	200	213	109	117	306	306	367	369	163	163
83	204	213	109	109	306	306	352	367	163	163
84	202	215	109	111	306	318	352	352	163	169
85	202	215	105	105	306	306	352	373	163	169
86	200	200	109	111	304	306	352	373	163	169
87	200	213	105	113	306	330	352	367	163	168
88	200	200	115	117	304	316	344	350	163	169
89	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
90	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
91	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
92	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
93	204	213	105	113	304	304	352	373	163	163
94	202	213	105	113	304	306	347	347	163	163
95	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
96	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
97	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
98	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
99	213	213	111	113	304	318	361	367	163	163
100	200	215	105	109	304	306	352	373	163	165

Anexo 3. Huella genética del multiplex de melina 2.

MM2										
Código extracción TEC	M5		MELDI6		MELDI17		MELDI21		MELDI24	
	1	103	105	297	301	144	150	241	257	209
2	103	107	297	303	146	154	225	257	209	209
3	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
4	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
5	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
6	107	122	299	307	146	154	225	241	209	221
7	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
8	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
9	103	114	297	299	144	156	225	257	215	235
10	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
11	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
12	107	107	299	303	146	154	241	241	221	221
13	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
14	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
15	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
16	105	105	297	303	150	150	241	243	211	219
17	103	107	297	299	144	146	225	257	209	209
18	107	120	299	301	144	146	241	249	221	221
19	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
20	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
21	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
22	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
23	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
24	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
25	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
26	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
27	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
28	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
29	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
30	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209
31	103	122	297	299	144	146	225	257	209	209

32	103	107	297	299	144	146	225	257	209	209
33	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
34	103	107	297	299	144	146	225	257	209	209
35	103	107	297	299	144	146	225	257	209	215
36	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
37	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
38	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
39	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
40	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
41	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
42	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
43	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
44	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
45	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
46	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
47	103	105	297	301	144	150	241	257	209	221
48	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
49	105	107	299	303	146	154	241	241	221	221
50	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
51	107	130	299	303	148	158	225	225	221	221
52	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
53	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
54	107	107	299	307	144	154	225	241	229	235
55	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
56	120	120	299	299	154	154	225	241	221	221
57	122	130	299	299	146	150	225	225	209	219
58	122	130	299	299	146	150	225	225	209	219
59	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
60	107	122	299	299	144	158	225	225	209	221
61	103	120	299	299	146	154	225	243	209	221
62	103	107	299	303	148	158	249	249	209	221
63	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
64	103	120	299	299	146	154	225	243	209	221
65	118	122	303	303	150	150	241	241	221	235
66	103	120	299	299	146	154	225	243	209	221
67	103	120	299	299	146	154	225	243	209	221
68	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221

69	118	122	303	303	150	150	241	241	221	235
70	118	122	299	303	144	144	249	257	215	217
71	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
72	122	122	299	299	146	150	241	241	209	221
73	118	122	299	299	144	144	225	241	211	221
74	118	122	299	299	144	144	225	241	211	221
75	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
76	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
77	107	107	303	307	144	158	241	249	209	235
78	107	122	299	303	148	150	241	249	221	235
79	107	122	299	299	144	158	257	261	221	221
80	103	120	297	299	144	154	249	249	215	221
81	107	122	299	299	144	158	257	261	221	221
82	122	122	297	299	144	154	241	243	211	221
83	103	122	297	299	144	154	225	241	215	221
84	107	122	299	299	144	158	257	261	221	221
85	103	122	297	303	146	150	225	225	219	221
86	107	122	299	299	144	146	241	241	211	221
87	107	122	299	303	142	144	225	225	209	219
88	107	122	299	303	148	150	241	249	209	221
89	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
90	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
91	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
92	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
93	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
94	103	105	303	307	154	154	241	241	221	221
95	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
96	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
97	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
98	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
99	107	118	299	301	146	156	225	241	209	227
100	122	122	299	299	146	150	241	241	209	221

Anexo 4. Genotipos multilocus ordenados con genotipos multilocus coincidentes repetidos enumerados.

Código extracción TEC	Genotipo	Nivel
63	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
68	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
75	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
76	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
89	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
90	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
91	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
92	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
93	103105204213105113163163154154304304241241221221303307352373g	A
1	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
4	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
5	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
10	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
11	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
21	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
42	103105213215113113165169144150304306241257209221297301352373g	B
17	103107202215105105165169144146304306225257209209297299352367g	C
32	103107202215105105165169144146304306225257209209297299352367g	C
34	103107202215105105165169144146304306225257209209297299352367g	C
61	103120200200113117163163146154304308225243209221299299365367g	D
66	103120200200113117163163146154304308225243209221299299365367g	D
67	103120200200113117163163146154304308225243209221299299365367g	D
13	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
19	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
24	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
26	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
27	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
28	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
29	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
30	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
31	103122202215109109165169144146306306225257209209297299352373g	E
15	105107204213105117163163146154306306241241221221299303352373g	F
40	105107204213105117163163146154306306241241221221299303352373g	F

48	105107204213105117163163146154306306241241221221299303352373g	F
23	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
71	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
95	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
96	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
97	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
98	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
99	107118213213111113163163146156304318225241209227299301361367g	G
7	107122200200105113163168142144306330225225209219299303352367g	H
8	107122200200105113163168142144306330225225209219299303352367g	H
20	107122200200105113163168142144306330225225209219299303352367g	H
25	107122200200105113163168142144306330225225209219299303352367g	H
33	107122202213105105163163144158306306225225209221299299373373g	I
52	107122202213105105163163144158306306225225209221299299373373g	I
60	107122202213105105163163144158306306225225209221299299373373g	I
79	107122202215109111163169144158306318257261221221299299352352g	J
81	107122202215109111163169144158306318257261221221299299352352g	J
84	107122202215109111163169144158306318257261221221299299352352g	J
14	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359373g	K
36	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359373g	K
38	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359373g	K
39	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359373g	K
65	118122200200117117163168150150304306241241221235303303369373g	L
69	118122200200117117163168150150304306241241221235303303369373g	L
73	118122213213105111165169144144306306225241211221299299352352g	M
74	118122213213105111165169144144306306225241211221299299352352g	M
3	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367373g	N
41	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367373g	N
45	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367373g	N
53	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367373g	N
56	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367373g	N
72	122122200215105109163165146150304306241241209221299299352373g	O
100	122122200215105109163165146150304306241241209221299299352373g	O
57	122130202213105111163168146150304318225225209219299299352367g	P
58	122130202213105111163168146150304318225225209219299299352367g	P
94	103105202213105113163163154154304306241241221221303307347347g	1
47	103105213215105113165169144150304306241257209221297301352373g	2
2	103107200200109109163169146154306306225257209209297303359367g	3
62	103107200213113113163169148158304304249249209221299303367373g	4
35	103107204215105105163169144146304306225257209215297299359373g	5

9	103114211211109109168169144156306306225257215235297299352367g	6
64	103120202213105105163163146154306306225243209221299299373373g	7
80	103120213213105109163169144154306306249249215221297299367373g	8
85	103122202215105105163169146150306306225225219221297303352373g	9
83	103122204213109109163163144154306306225241215221297299352367g	10
16	105105204215105117163163150150304306241243211219297303352367g	11
49	105107202213105117163163146154306306241241221221299303352373g	12
43	105107204213105117163163146154306306241241221221299303359359g	13
44	105107213213105117163163146154306318241241221221299303359373g	14
12	107107204213105117163163146154306306241241221221299303352373g	15
77	107107211211115117163169144158306316241249209235303307352356g	16
54	107107215215113115168168144154306318225241229235299307350356g	17
18	107120204213105117163163144146306330241249221221299301350367g	18
86	107122200200109111163169144146304306241241211221299299352373g	19
88	107122200200115117163169148150304316241249209221299303344350g	20
78	107122200200115117163169148150304316241249221235299303344350g	21
87	107122200213105113163168142144306330225225209219299303352367g	22
22	107122200215105113163168142144306330225225209219299303352367g	23
59	107122202213105105163163144158306306225225209221299299347373g	24
50	107122202213105111163163144158306306225225209221299299373373g	25
6	107122204213109109165169146154304306225241209221299307367367g	26
46	107122213215105113163169144158306306225225209221299299352373g	27
51	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359359g	28
37	107130213213105117163163148158306318225225221221299303359367g	29
70	118122211215109113163169144144304306249257215217299303369369g	30
55	120120213213109111163165154154304306225241221221299299367367g	31
82	122122200213109117163163144154306306241243211221297299367369g	32

Anexo 5. Frecuencias alélicas por microsatélite de los 48 individuos.

Microsatélite	Alelo	Frecuencia alélica	Microsatélite	Alelo	Frecuencia alélica
M5	103	0,156	MELDI2	304	0,229
	105	0,104		306	0,604
	107	0,323		308	0,010
	114	0,010		316	0,031
	118	0,042		318	0,083
	120	0,083		330	0,042
	122	0,240		225	0,396
	130	0,042		241	0,365
M8	200	0,198	MELDI21	243	0,042
	202	0,115		249	0,094
	204	0,094		257	0,094
	211	0,052		261	0,010
	213	0,396		209	0,260
	215	0,146		211	0,042
MELDI1	105	0,354	MELDI24	215	0,052
	109	0,188		217	0,010
	111	0,083		219	0,063
	113	0,156		221	0,500
	115	0,042		227	0,010
	117	0,177		229	0,010
MELDI11	163	0,625	MLEDI7	235	0,052
	165	0,094		344	0,021
	168	0,083		347	0,031
	169	0,198		350	0,042
MELDI17	142	0,031	352	0,250	
	144	0,260	356	0,021	

	146	0,188		359	0,094
	148	0,063		361	0,010
	150	0,115		365	0,010
	154	0,219		367	0,219
	156	0,021		369	0,042
	158	0,104		373	0,260
	<hr/>				
	297	0,125			
	299	0,542			
MELDI6	301	0,042			
	303	0,240			
	307	0,052			
	<hr/>				

Anexo 7. Significado de los acrónimos utilizados.

Acrónimos	Significado
HCl	Ácido clorhídrico
NaCl	Cloruro de sodio
RAPD	ADN polimórfico amplificado aleatoriamente
ISSR	Repeticiones de secuencias simples intersimples
SSR	Secuencias simples repetidas
ADN	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
TE	Tris-EDTA
TAE	Tris-Acetato-EDTA
MgCl ₂	Cloruro de magnesio
DNTPs	Desoxirribonucleósidos trifosfato
BSA	Bovine sereum albumin
DMSO	Dimetilsulfóxido