



TÍTULO

**DIVERSIDAD GENÉTICA DE ECOTIPOS DE TECA
(*Tectona Grandis L.*) DEL LITORAL ECUATORIANO**

AUTOR

José Enrique Nieto Rodríguez

Director
Curso
ISBN

Esta edición electrónica ha sido realizada en 2011

Netzahualcoyotl Mayek Pérez

Máster Universitario en Biotecnología de Plantas

978-84-694-6981-1

© José Enrique Nieto Rodríguez

© Para esta edición, la Universidad Internacional de Andalucía



Reconocimiento-No comercial-Sin obras derivadas

Usted es libre de:

- Copiar, distribuir y comunicar públicamente la obra.

Bajo las condiciones siguientes:

- **Reconocimiento.** Debe reconocer los créditos de la obra de la manera especificada por el autor o el licenciadore (pero no de una manera que sugiera que tiene su apoyo o apoyan el uso que hace de su obra).
 - **No comercial.** No puede utilizar esta obra para fines comerciales.
 - **Sin obras derivadas.** No se puede alterar, transformar o generar una obra derivada a partir de esta obra.
-
- *Al reutilizar o distribuir la obra, tiene que dejar bien claro los términos de la licencia de esta obra.*
 - *Alguna de estas condiciones puede no aplicarse si se obtiene el permiso del titular de los derechos de autor.*
 - *Nada en esta licencia menoscaba o restringe los derechos morales del autor.*



UNIVERSIDAD INTERNACIONAL DE ANDALUCÍA
Sede Iberoamericana Santa María de La Rábida

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE ECOTIPOS DE TECA
(*Tectona grandis* L.) DEL LITORAL ECUATORIANO”**

T E S I S

PARA OPTAR POR EL GRADO DE

MASTER EN

BIOTECNOLOGÍA DE PLANTAS

PRESENTA

José Enrique Nieto Rodríguez

DIRIGIDA POR

Dr. Netzahualcoyotl Mayek Pérez

Huelva, Andalucía, España

Febrero de 2010

DEDICATORIA



*At Dios, a mi esposa, padres y
hermana por brindarme en todo
momento el apoyo necesario
para alcanzar las metas*

*At los docentes e investigadores
quienes hicieron posible la
culminación del presente trabajo.*

José Enrique Nieto Rodríguez

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), Institución de educación superior que me acogió como estudiante y posteriormente me abrió sus puertas para desarrollarme de manera profesional.

Al Ing. Manuel Haz Álvarez, ex Rector de la UTEQ por apoyarme en todo lo necesario para mi participación en la maestría y en el buen desempeño dentro de la misma.

Al M.C. Gorki Díaz Coronel y Luis Ramos Gavilanes, Director de la UICYT y del LABBIO de la UTEQ, por su eterno apoyo hacia mi persona.

Al Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica, por ofrecerme sus instalaciones para materializar esta meta, y a todo el personal que en el labora por el apoyo y facilidades brindadas en el desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al proyecto CICYTPP0039WQSCON-UTEQ-CONESUP por el financiamiento otorgado a este proyecto de investigación.

Al Dr. Netzahualcóyotl Mayek Pérez, por compartir sus conocimientos como mi asesor académico y director de esta tesis: por ayudarme a materializar este anhelado logro.

Al Dr. Victoriano Valpuesta, Director de la maestría: a los doctores Juan Muñoz Blanco y Luis Caballero, Co-directores de la maestría: por su valiosa aportación y sugerencias en el desarrollo y culminación de este trabajo.

A la M. C. Sanjuana Hernández Delgado por su valioso apoyo en el desarrollo experimental técnico y estadístico de este trabajo, respectivamente.

A mis compañeros de trabajo y de laboratorio: Silvia, Mercedes, Ximena, Fabricio, Orly, Nicolás, Jaime y Juanito.

Gracias a Dios por estar siempre pendiente de mi en todo momento y por ayudarme a culminar este objetivo.

A mi esposa Angélica María Fon Fay por su incondicionalidad, por su amor y por su entrega, pilar fundamental en mi vida.

A mi padre Cesar Enrique Nieto, a mi madre Mariana Rodríguez y a mi hermana María Fernanda Nieto Rodríguez por brindarme su infinito apoyo en todo momento.

A todas y cada una de las personas que de una u otra forma ayudaron a que alcance esta meta.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Página
LISTA DE CLAVES Y ABREVIATURAS	
ÍNDICE DE CUADROS	
ÍNDICE DE FIGURAS	
RESUMEN	
SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1. Generalidades sobre la teca	3
2.1.1. Importancia económica	3
2.1.2. Dendrología	3
2.1.3. Distribución geográfica	4
2.2. Introducción de germoplasma	5
2.2.1. Análisis de la diversidad genética	5
2.2.2. Técnicas para el estudio y análisis de la diversidad genética	7
2.3. Marcadores moleculares	8
2.3.1. Marcador molecular	8
2.3.2. Marcadores basados en PCR	8
2.3.3. Marcadores moleculares RAPD	9
2.3.4. Marcadores moleculares AFLP	10
3 JUSTIFICACIÓN	12
4 OBJETIVOS	13
5 HIPÓTESIS	13
6 MATERIALES Y MÉTODOS	14
6.1 Localización	14
6.2 Material vegetal	14
6.3 Parámetros de crecimiento	14
6.4 Análisis genético	15
6.4.1 Extracción del ADN	15
6.4.2 Amplificación del ADN con oligonucleótidos decaméricos	17
6.4.3 Análisis AFLP	19
6.4.4 Análisis estadístico	22
6.4.5 Datos AFLP	22
7 RESULTADOS	25
7.1 Análisis de campo	25
7.2 Obtención de ADN y amplificación	26
7.3 Análisis AFLP	27
8 DISCUSIÓN	32
8.1 Aislamiento y amplificación de ADN de teca	32
8.2 Análisis AFLP	34
9 CONCLUSIONES	38
10 RECOMENDACIONES	39
11 BIBLIOGRAFÍA	40
12 GLOSARIO	48

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Origen y parámetros del crecimiento de ecotipos de <i>T. grandis</i> del Litoral Ecuatoriano.	15
Cuadro 2. Lista de los nueve oligonucleótidos decaméricos utilizados en el análisis RAPD de <i>T. grandis</i> L. de Ecuador.	18
Cuadro 3. Origen y parámetros del crecimiento de ecotipos de <i>T. grandis</i> del Litoral Ecuatoriano.	25
Cuadro 4. Productos RAPD amplificados con nueve oligonucleótidos decaméricos en diez ecotipos de <i>T. grandis</i> L.	27
Cuadro 5. Productos amplificados y polimorfismos obtenidos por combinación de iniciadores AFLP.	27
Cuadro 6. Análisis de varianza molecular de germoplasma de teca del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP.	28
Cuadro 7. Diversidad genética por combinación de iniciadores AFLP y por ecotipo en <i>T. grandis</i> L. del Litoral Ecuatoriano.	28

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del ADN extraído de hojas jóvenes de <i>T. grandis</i> perteneciente a 10 ecotipos de tecla del Ecuador.	25
Figura 2 Dendrograma de ecotipos de <i>T. grandis</i> L. del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP y el algoritmo UPGMA.	28
Figura 3 Estructura de poblaciones de <i>T. grandis</i> L. del Litoral Ecuatoriano de acuerdo con el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano.	30
Figura 4. Análisis filogenético de ecotipos de <i>T. grandis</i> L. del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP y el algoritmo del 'vecino más cercano' (Neighbor-Joining).	31

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis* L.) es una especie vegetal maderable originaria de Indochina e introducida al Ecuador, donde se ha adaptado y adquirido gran importancia económica y ecológica por su rápido crecimiento, buen acabado en las características de la madera y alta aportación de biomasa al suelo. En la actualidad tiene gran demanda en los programas de reforestación de zonas que presentan problemas por erosión. Este trabajo tuvo como objetivo analizar algunos parámetros de crecimiento y la diversidad genética de doce ecotipos de teca del Ecuador. Los ecotipos de Guayas-El Oro mostraron árboles muy vigorosos así como los del INIAP-Pichilingue (introducción original). El análisis de varianza molecular indicó variación genética significativa entre y dentro de ecotipos de teca. El análisis de conglomerados con base en datos AFLP presentó la formación de dos grupos de ecotipos, uno que incluyó al ecotipo de Costa Rica y los de Quinindé, Pichincha, Portoviejo, La Unión, Zavala, Puerto Cayo y Suástegui; el otro grupo incluyó ecotipos de INIAP, Tenguel, Ventanas y Arámbulo. Las poblaciones jóvenes ecuatorianas de teca provienen probablemente de introducciones procedentes de Costa Rica. El análisis genético permitió sugerir dos posibles eventos de introducción de la teca al Ecuador, uno originado a partir de un ecotipo de Costa Rica y otro de la Estación Experimental Tropical “Pichilingue” del INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). Los resultados evidencian la variabilidad genética de la teca producto de la constante recombinación genética que ocurre en la especie y, además, la introducción de nuevos ecotipos genéticamente diversos y distintos a las primeras introducciones.

SUMMARY

Teak (*Tectona grandis* L.) is a woody species which was originated at Indochina and introduced to Ecuador where has been well adapted and acquired great economic and ecological importance due its fast growth, good wood traits as well as high biomass production available for soils. Currently, teak wood is highly demanded to reforest soils with erosion. This work had the aim to analyze some growth parameters on well on the genetic diversity of twelve teak ecotypes from Ecuador. Teak ecotypes from Guayas-El Oro and INIAP-Pichilingue (original introduction site) showed the most vigorous tree. The analysis of molecular variance indicated significant genetic variation among and within teak ecotypes. Cluster analysis based on AFLP data showed two groups of teak ecotypes, one included one ecotype from Costa Rica as well as ecotypes from Quinindé, Pichincha, Portoviejo, La Unión, Zavala, Puerto Cayo, and Suástegui; the other group included ecotypes from INIAP, Tenguel, Ventanas, and Arámbulo. Later and younger teak populations in Ecuador probably were originated from introductions from Costa Rica. Genetic analysis suggests two introduction events, one from the Costa Rica ecotype and the other from Estación Experimental Tropical “Pichilingue” - INIAP (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias). Results indicate the genetic variability of teak ecotypes due constant genetic recombination as well as the introduction of new ecotypes genetically diverse and differentiated from former introductions.

1. INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis* L.) es un árbol originario de la India, Tailandia y Laos. En los países tropicales de América Latina se introdujo aproximadamente hace 100 años. La última cifra oficial estima que las plantaciones en el mundo alcanzan los 3 millones de hectáreas (Centeno, 1997).

La teca se ha adaptado a las condiciones de Ecuador y adquirido gran importancia económica y ecológica por su rápido crecimiento, buen acabado en las características de la madera y alta aportación de biomasa al suelo. En la actualidad tiene gran demanda en los programas de reforestación de zonas que presentan problemas por erosión (Betancourt, 1995).

La primera plantación de teca del Ecuador se estableció en 1950 en la Estación Experimental Pichilingue del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en Quevedo, con semillas procedentes de la India. A partir de ella se expandieron nuevas plantaciones como monocultivo. De la falta de información precisa al respecto radica la importancia de determinar si la mayoría de las plantaciones forestales de teca del Litoral Ecuatoriano provienen de Pichilingue o de otras procedencias introducidas al país posteriormente (Canchignia-Martínez *et al.*, 2007).

La propagación de la teca se realiza de manera común por la vía sexual, utilizando semilla cuyo origen se desconoce. Generalmente, las plantas de las cuales se toman las semillas no se seleccionan por su origen ni por sus características fenotípicas, entonces se origina alta variabilidad fenotípica y genética en las plantaciones establecidas posteriormente.

La presente investigación pretende mejorar el conocimiento sobre la diversidad genética de las poblaciones de teca del Ecuador, lo que permitirá establecer bases para el mejoramiento genético forestal orientado al aumento de los índices de producción y la rentabilidad de la especie. Para la consecución de este fin nos valdremos de la aplicación de las técnicas que la biología molecular ofrece como los marcadores moleculares de ADN que constituyen una herramienta poderosa para el estudio de la diversidad de poblaciones de plantas a nivel genómico (Neale *et al.*,1991; Iglesias y García, 1999; Ahuja, 2001).

2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades sobre la teca.

2.1.1 Importancia económica

Goh y Monteuis (1998) indican que la teca (*T. grandis* L.) ha ganado buena reputación en el ámbito mundial de la producción y comercialización de la madera propiciado por su buena calidad y acabado. Por ello, en los últimos años se ha experimentado un aumento progresivo en su demanda en los mercados mundiales como madera preciosa. La teca es una especie tropical introducida de la India, que en el Ecuador se ha adaptado y adquirido gran importancia económica y ecológica por su rápido crecimiento, buen acabado de la madera y alta aportación de biomasa al suelo. Tiene gran demanda en los programas de reforestación para zonas que presentan problemas de erosión por la tala indiscriminada de sus árboles.

2.1.2 Dendrología.

Little y Dixon (1969) mencionan que en su lugar de origen la teca es un árbol grande pues alcanza hasta 45 m de alto y de 55 a 80 cm de diámetro del fuste a la altura del pecho (DAP) y, a menudo, muestra raíces tablares o tronco acanalado. En cambio, Betancourt (1987) manifiestan que la teca puede alcanzar en su hábitat natural hasta 60 m de altura, DAP de hasta 2.6 m y tronco libre de ramas de 30 m.

La teca es una especie caducifolia y de corteza exterior color café claro, escamosa y muy agrietada de más de 1 cm de grueso. Las ramas extendidas forman una copa abierta color gris claro con pocas hojas muy grandes. Las ramas nuevas son color verde; el follaje y los racimos florales está cubiertos con una especie de vello color verde gris en forma de estrella (Betancourt, 1995).

2.1.3 Distribución geográfica

Little y Dixon (1969) señalan que *T. grandis* es nativa del sur de Asia, la India y Malasia y fue introducida hace 100 años a América. Por otra parte, Weaver (1993) sostiene que la distribución natural del género es discontinua ya que puede encontrarse en la India, Laos, Tailandia y Filipinas. Es probable que la teca no sea autóctona de Indonesia y se supone que fue introducida a Java hace más o menos 500 años. En la actualidad, el árbol de teca está distribuido en casi todas las áreas tropicales del planeta en plantaciones establecidas por el hombre. En Asia el árbol de teca se desarrolla en forma natural en varios tipos de bosques deciduos alcanzando dimensiones mayores en climas húmedo-tropicales que presenten un marcado período de sequía durante el año. La teca es una especie pionera con un largo ciclo de vida y que es capaz de persistir, dominar y regenerarse naturalmente hasta llegar a una fase de sucesión clímax de su rango natural. Los crecimientos óptimos se alcanzan donde la precipitación media anual se encuentra entre los 1,200 a 2,500 mm por año y ésta se produce en un 75% durante el período de lluvia. En el bosque natural los árboles de teca se encuentran en forma aislada pero pueden formar agrupaciones prácticamente puras en lugares donde las condiciones son favorables. Los bosques de teca se encuentran generalmente en terrenos de colinas onduladas pero también se pueden desarrollar en terrenos planos aluviales. Su altitud máxima de

distribución son los 1,000 msnm. Los suelos óptimos para el crecimiento de la teca son profundos y bien drenados, como los fértiles suelos aluviales y coaluviales con pH entre 6.8 y 8.0 y relativamente ricos en calcio (Ca) y fósforo (P). La teca no tolera los suelos inundables o suelos lateríticos infértiles (Centeno, 1997).

2.2 Introducción de germoplasma

En términos generales cuando se introduce germoplasma a un país debe hacerse referencia a la procedencia y luego evaluar su crecimiento en todas las fases de desarrollo y en las diferentes estaciones del año con base en los distintos orígenes geográficos y naturales y las razas geográficas de las especies (Hamrick y Godt, 1989). Los investigadores forestales han reconocido que el uso de semillas con origen geográfico diferente de la especie para el establecimiento de plantaciones puede conducir a diferencias en el crecimiento y desarrollo. Las diferencias dentro de una especie en un lote de semillas pueden resultar en plantaciones exitosas o en plantaciones que fracasan. Por ello es importante conocer el origen de la semilla y, por tanto, obtener semilla de los mejores árboles. El desconocimiento del comportamiento de las procedencias puede afectar la velocidad del crecimiento; la rectitud del fuste; la resistencia a sequía, plagas, enfermedades, salinidad y acidez de los suelos; etc. (Ueff *et al.*, 1982).

2.2.1 Análisis de la diversidad genética

La diversidad genética en especies forestales se fundamenta en la existencia de la variabilidad y se refiere a aquellas características no fijadas en una

especie, por lo que cambia de un individuo a otro dentro de ella (González y Simpson, 1997). El conocimiento de la diversidad genética y de las relaciones entre genotipos es importante para el desarrollo de estrategias adecuadas para la conservación *in situ* de bosques naturales y la regeneración de áreas boscosas degradadas.

Poblaciones de *Schizolobium parahybum*, de Ecuador (9), Brasil (3), Bolivia (1), Costa Rica (1) y Perú (1) se analizaron con tres sistemas de marcadores moleculares (RAPD, AFLP y SSR) para estudiar los patrones de diversidad y las relaciones genéticas entre ellos así como para identificar el origen del germoplasma cultivado en Ecuador. Aunque los marcadores AFLP fueron más informativos los SSRs lograron diferenciar los ecotipos del Ecuador con base en su origen geográfico y genético (Canchignia-Martinez *et al.*, 2007).

En cedro (*Cedrela odorata* L.) se estudió la diversidad genética de nueve poblaciones de la Amazonía Peruana con la finalidad de determinar los niveles de diversidad genética con base en marcadores AFLP. El análisis de varianza molecular indicó diferencias significativas entre las jerarquías analizadas (entre grupos de poblaciones; entre poblaciones y dentro de poblaciones) además de la asociación entre las distancias geográficas y las distancias genéticas entre ecotipos (De la Torre *et al.*, 2008)

Diaz *et al.* (2001), por su parte, evaluaron la variación genética de diez poblaciones de *Pinus oocarpa* procedentes de tres regiones geográficas de Nicaragua empleando marcadores RAPD y AFLP. Ambos marcadores revelaron altos niveles de diversidad en las poblaciones analizadas. El estudio indicó que la mayor proporción de la variación genética figuró dentro de las poblaciones,

pero también existían niveles importantes de diferenciación entre las diferentes poblaciones de *Pinus*.

Los impactos de la fragmentación del bosque sobre la diversidad genética y el flujo de genes se han examinado en diversas especies vegetales con base en el uso de los marcadores moleculares. Por ejemplo, en *Swietenia humilis* (caoba o `pseudo-caoba`), especie frondosa tropical se compararon árboles provenientes de un pastizal con los de un bosque adyacente no perturbado y se observaron niveles análogos de diversidad genética a pesar del menor número de alelos presentes en los árboles del pastizal (White y Powell, 1997). Esto ha llevado al desarrollo de procedimientos analíticos más eficaces para asignar genotipos a las poblaciones de origen e identificar inmigraciones recientes dentro de las poblaciones. El conocimiento de las estructuras genéticas de las poblaciones y de la diversidad genética de la especie es necesario para la utilización sostenible y para aplicar las estrategias de conservación de los recursos genéticos forestales óptimas (Buther *et al.*, 2003).

2.2.2 Técnicas para el estudio y análisis de la diversidad genética.

Para medir la diversidad genética en especies maderables se han utilizado diferentes tipos de marcadores genéticos para demostrar y medir la diversidad genética en especies forestales de importancia. Lo anterior se ha obtenido gracias a la utilización de marcadores isoenzimáticos y también de aquéllos basados en la amplificación del ADN por PCR como los RAPDs y los AFLPs para detectar la variación con mayor precisión tanto en regiones codificantes como no codificantes, lo que genera mayor número de marcadores polimórficos (Gonzalez *et al.*, 2003).

2.3. Marcadores moleculares

2.3.1 Marcador molecular

Se define como marcador molecular a cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen, como son los casos de las isoenzimas o de los segmentos específicos de ADN. Los marcadores isoenzimáticos son llamados marcadores bioquímicos. La secuencia de nucleótidos y la función de un marcador pueden o no conocerse aunque por lo general son desconocidos. Se define a un marcador molecular como un marcador genético (Ferreira y Grattapaglia, 1995). En el análisis molecular de la variabilidad del ADN un marcador molecular permite determinar puntos de referencia en los cromosomas conocidos como “marcadores moleculares”. Éstos se definen como cualquier fenotipo molecular proveniente de un gen expresado o bien, como segmentos específicos de ADN que representan regiones expresadas o no del genoma (Tonon *et al.*, 2004).

2.3.2 Marcadores basados en PCR

El gran avance en el área de los marcadores moleculares basados en PCR ocurrió en 1990 con la idea de utilizar “iniciadores” cortos con secuencias arbitrarias para dirigir la reacción de amplificación, con lo que se eliminó la necesidad del conocimiento previo de la secuencia como ocurre actualmente con los microsatelites (Ferreira y Grattapaglia, 1995). La tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR – ‘Polymerase Chain Reaction’) fue concebida por Kary Mullis (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985) y, desde entonces, revolucionó la biología molecular tanto al ayudar a la comprensión

de los procesos biológicos como en las áreas aplicadas incluyendo el diagnóstico y la mejora genética de las plantas y animales domésticos. La PCR es una técnica que comprende la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de la enzima ADN polimerasa. Un ciclo de PCR consta de tres etapas: desnaturalización, alineación y polimerización. En la primera, el ADN de doble cadena se desnaturaliza mediante el aumento de la temperatura (de 92 a 95 °C). En la segunda etapa, la temperatura se reduce rápidamente entre 35 y 60 °C dependiendo esencialmente del tamaño y de la secuencia del iniciador utilizado lo que permite la hibridación ADN-ADN de dicho iniciador con las secuencias complementarias que flanquean la región blanco. Enseguida, la temperatura se eleva a 72 °C para que la enzima ADN polimerasa realice la extensión de la cadena a partir del terminal 3' de los iniciadores mediante la incorporación de nucleótidos utilizando como molde la secuencia blanco. Una vez que la cantidad de ADN de la secuencia-blanco se duplica cada ciclo la amplificación sigue una progresión geométrica (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

2.3.3 Marcadores moleculares RAPD

Los “iniciadores” RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) se sintetizan artificialmente de manera que sus secuencias de nucleótidos son complementarias a las secuencias específicas que flanquean a la región “blanco”. Esta escala de amplificación permite, por lo tanto, iniciar con cantidades mínimas de ADN (del orden de algunos picogramos o nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de ADN de la secuencia específica de interés (Ferreira y Grattaglia, 1995). Los RAPDs son un método rápido y económico para el análisis genómico a pesar de ser marcadores dominantes. Una desventaja de los RAPDs es su baja reproducibilidad sobre

todo entre distintos laboratorios. Esto se debe a que la hibridación de los cebadores del ADN son sensible a diversos factores entre ellos la temperatura y la concentración de sales; frecuentemente su unión al ADN es poco estable y puede no reproducirse en posteriores experimentos. Una particularidad de estos marcadores es que no requieren del conocimiento previo de la secuencia del ADN y se necesita poca cantidad y calidad del mismo para la amplificación (Caballero *et al.*, 2001).

2.3.4 Marcadores moleculares AFLP

A la fecha se han mejorado las tecnologías de marcadores moleculares para la caracterización genética de plantas y otros organismos. La técnica AFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados) conceptualmente es simple y combina las técnicas RFLP (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción) y RAPD (Vos *et al.*, 1995). En el AFLP, el ADN genómico primero se corta con dos enzimas de restricción, una de corte raro (por ejemplo, *EcoRI*) y otra de corte frecuente (por ejemplo, *MseI*). Luego, oligonucleótidos denominados “adaptadores” se ligan a los extremos de éstos fragmentos de restricción. Un adaptador consiste de un conjunto de nucleótidos de unión específica a los sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas y sirve como base para la amplificación selectiva. Con la utilización de los iniciadores correspondientes a los sitios de restricción *EcoRI* y *MseI*, sólo aquellos fragmentos con un sitio *EcoRI* y *MseI* en uno de los dos extremos se amplificarán por PCR. Esta amplificación inicial puede reducir el número total de fragmentos de restricción que luego se someten a una amplificación selectiva utilizando iniciadores que corresponden a las secuencias del adaptador y al sitio de restricción, además de cero a cinco nucleótidos adicionales en los extremos 3' extendiéndose hacia dentro de los

fragmentos de restricción. La amplificación es selectiva porque un nucleótido selectivo de cada iniciador resultará en la amplificación de solo uno de 16 fragmentos, mientras que dos bases selectivas disminuirán el número a 1/256 fragmentos (Vos *et al.*, 1995). La razón primaria de la superioridad de la técnica AFLP respecto a otras es que detecta un alto número de bandas de ADN facilitando la identificación de muchos marcadores polimórficos. Aunque esta técnica no ofrece necesariamente altas tasas de polimorfismo es más eficiente que los RFLPs y los RAPDs para detectar ADN polimórfico (Nuez y Carrillo, 2000). Los AFLPs se han utilizado, por ejemplo, en el análisis de la variabilidad genética y en la búsqueda de marcadores en las proximidades de genes mayores de interés o cartografía genética (Nuez y Carrillo, 2000).

3. JUSTIFICACIÓN

En Ecuador, la disponibilidad de semilla de teca con algún grado de mejora genética obtenida de áreas productoras de semillas o de huertos semilleros es nula; además, no existen programas destinados a la mejora genética de esta especie. Por otro lado, la teca se introdujo y propagó de una manera desorganizada y se desconoce la procedencia de las diferentes poblaciones establecidas en el país. Lo anterior limita y hasta cierto punto imposibilita la ejecución de programas de manejo genético a partir del conocimiento de los patrones de diversidad genética de las pocas poblaciones existentes de *T. grandis*. El conocimiento de los patrones de variabilidad genética del germoplasma Ecuatoriano de teca permitirá determinar su potencial genético para la formulación y ejecución de programas orientados a su conservación y mejora y, de esta manera, establecer las bases para estructurar un programa integral de mejoramiento de una de las especies maderables de mayor importancia nacional y así contribuir al desarrollo del sector forestal del Ecuador.

4. OBJETIVOS

Objetivo General:

Analizar la diversidad genética de ecotipos de *Tectona grandis* L. del Ecuador.

Objetivos específicos:

- i) Estandarizar un protocolo de extracción y purificación de ADN de teca.
- ii) Establecer un procedimiento AFLP para el análisis de la diversidad genética de germoplasma de teca del Ecuador.

5. HIPÓTESIS

- i) Existe variabilidad genotípica significativa en el germoplasma de *T. grandis* L. del Ecuador.
- ii) Las poblaciones de *T. grandis* L. del Ecuador están altamente emparentadas entre sí en virtud de tener un origen genético común.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Localización.

La presente investigación se llevó a cabo en dos fases. La primera consistió en la colecta de poblaciones de *T. grandis* en el Litoral Ecuatoriano durante el año 2007. La segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Biotecnología Genómica del Instituto Politécnico Nacional (CBG-IPN) en Reynosa, Tamaulipas, México durante el 2008.

6.2. Material vegetal.

Muestras de hojas jóvenes de once poblaciones de *T. grandis* se colectaron en diferentes provincias del Litoral Ecuatoriano. Como testigo se incluyó un ecotipo de teca proveniente de Costa Rica (Cuadro 1). Las hojas de *T. grandis* se clasificaron de acuerdo con su origen y procedencia y, posteriormente, se trasladaron al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil, Ecuador, donde se extrajo el ADN para su posterior análisis.

6.3. Parámetros del crecimiento

Cuatro parámetros del crecimiento de la teca (altura total, diámetro a la altura del pecho -DAP-, área basal y volumen) se registraron en cada uno de cinco árboles por cada ecotipo con la finalidad de tener estimaciones de los diferentes niveles de crecimiento y de producción de madera.

Cuadro 1. Origen y parámetros del crecimiento de ecotipos de *T. grandis* del Litoral Ecuatoriano.

Localidad	Ubicación		
	Latitud Sur	Longitud Oeste	Altitud (msnm)
Macro – sitio Guayas – El Oro			
Arámbulo	01° 34´	79° 8´	54
Tenguel	02° 09´	79° 07´	45
Suástegui	01° 51´	79° 09´	40
Puerto Cayo	2° 14´	79° 06´	45
Macro – sitio Costa Rica			
Costa Rica	01° 05´	79° 04´	74
Macro – sitio Esmeraldas			
La Unión	0° 05´	79° 04´	84
Quinindé	0° 03´	79° 05´	95
Macro – sitio Los Ríos – Manabí			
INIAP	01° 05´	79° 07´	74
Ventanas	01° 25´	79° 27´	60
Zavala	0° 04´	79° 03´	90
Portoviejo	1° 03´	80° 39´	57
Pichincha	1° 04´	79° 08´	57

6.4. Análisis genético.

6.4.1. Extracción del ADN

Para la extracción y purificación del ADN de teca se evaluaron tres protocolos: Dellaporta *et al.* (1983), Doyle y Doyle (1987) y Uyemoto (1998).

El protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) consistió en macerar tejido con nitrógeno líquido (-196 °C) hasta obtener un polvo fino. Se añadió buffer de extracción (100 mM Tris-HCl, pH 9; 500 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β -Mercaptoetanol; SDS 20%) y se incubó en baño maría a 65 °C durante 10 min. Luego, se añadió acetato de potasio y se centrifugó a 1700 rpm por 30 min y se dejó reposar durante 12 h a 20 °C. Se realizó una segunda centrifugación para formar la pastilla de ADN y retirar el isopropanol. Luego, se añadió solución para diluir (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM EDTA); posteriormente, se aplicó fenol-cloroformo (25 : 1), se centrifugó y se extrajo el sobrenadante nuevamente colocarse en isopropanol (400 μ L) y acetato de sodio (60 μ L). Una vez formada, la pastilla se retiró invirtiendo el tubo Eppendorf y se dejó secar por 15 min. Las muestras se lavaron con etanol al 70% dos veces y se resuspendieron en TE 1X.

El protocolo de Doyle y Doyle (1987) consistió en macerar de 25 a 50 mg de tejido con nitrógeno líquido y se agregó 700 μ L de buffer de extracción (2 % CTAB, 1.42M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris HCl, pH 8.0 y 2% PVP 40) precalentado a 65°C. Luego, se agregó 0.5 mM de ácido ascórbico modificado (0,2% de β - mercaptoetanol) para después centrifugar a 13000 rpm por 2 min. Después, se recuperó el sobrenadante y se agregó 4 μ L de ARNasa (10 mg mL⁻¹), se mezcló por inversión y se incubó a 65°C por 5 min. Posteriormente, se agregó 570 μ L de cloroformo isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se precipitó el ADN adicionando 0.7 vol de isopropanol frío y se centrifugó a 13000 rpm por 5 min. Finalmente, el 'pellet' se lavó con etanol 70 % y el ADN se resuspendió en 15 μ L de TE 1X.

Finalmente, el protocolo de Uyemoto (1998) consistió en colocar el amortiguador CTAB a 65 °C durante 15 min (2% CTAB; 1.4 M NaCl; 20 mM

EDTA, pH 8; 100mM Tris HCl, pH 8; 0.2% de β -mercaptoetanol y agua ultrapura). Luego, se maceró 100 mg de tejido vegetal y se añadió 800 μ L del amortiguador CTAB para después incubar por 20 min a 60 °C; se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min y se recuperó el sobrenadante, al que se agregó 600 μ L de cloroformo - isoamílico 24:1 para luego centrifugar nuevamente a 13000 rpm por 5 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al que se agregó 1 vol de isopropanol frío; y la mezcla se colocó en hielo por 10 min para precipitar el ADN. Posteriormente se centrifugó a velocidad máxima por 8 min para luego desechar la fase acuosa. El `pellet` se enjuagó con etanol 80 % y se secó al ambiente para después resuspender en 25 μ L de TE. Finalmente, se agregó RNasa (10 μ g mL⁻¹) y se incubó por 1 h a 37 °C. Los ADN obtenidos se visualizaron en gel de agarosa al 1.2% .

6.4.2 Pruebas de amplificación del ADN con oligonucleótidos decamericos.

Para el desarrollo de las condiciones idóneas de la reacción RAPD se implementó la técnica descrita por Williams *et al.* (1990). La técnica consiste en una PCR con un volumen de reacción total de 25 μ L que incluye: 15.3 μ L de agua ultrapura; 2.5 μ L de Buffer PCR; 2.5 μ L de cloruro de magnesio; 2.0 μ L de dNTPs; 1.5 μ L de iniciadores; 0.2 μ L de Taq DNA Polimerasa y 1 μ L de ADN. Al principio se utilizó una solución amortiguadora de extracción con pH 9 y MgCl₂ 25 mM, pero posteriormente se utilizó una con pH 8.4 y 50 mM de MgCl₂. La amplificación del ADN se llevó a cabo en un termociclador **Techne**[®] Genius (Techne TC-412, EUA). Las condiciones de amplificación constaron de tres segmentos: primer segmento a 94 °C por 1 min; segundo segmento de 40 ciclos que comprendieron 94 °C por 1 min; 36 °C por 1.30 min y 72 °C por 2

min; así como un segmento final de extensión de 10 min a 72 °C, culminando a 4 °C. Los

fragmentos del ADN amplificado se separaron por electroforesis a 65 V por 3:5 h en un gel de agarosa al 2.4 %. Para la visualización de los productos de amplificación los geles se tiñeron con bromuro de etidio (10 mg mL⁻¹) para luego fotografiarse con una cámara digital en un transiluminador con luz UV.

En tres muestras de teca se evaluó la amplificación de 15 oligonucleótidos decaméricos. Además, se determinó la cantidad óptima de ADN para cada muestra (de ≥ 250 ng mL⁻¹) y la temperatura ideal de hibridación. Los oligonucleótidos evaluados fueron: AKPNI – 05, BKPNI – 03, BKPNI – 05, PSTI – 05, PSTI – 06, SACI – 05, rP – 01, rP – 02, rP – 03, rP – 04, OPA 2; OPA 12; OPA 16; OPA 15; OPC 1; OPC 4; OPC 7; OPC 8; OPC 9 y OPC 10. De los anteriores se seleccionaran nueve oligonucleótidos con base en los niveles de polimorfismo producidos (Cuadro 2).

Cuadro 2. Lista de oligonucleótidos decaméricos utilizados en el análisis RAPD de *T. grandis* L. de Ecuador.

Clave	Secuencia de iniciadores
OPC 1	5´ TTCCAGCCAG 3´
OPC 4	5´ CCGCATCTAC 3´
OPC 7	5´ GTCCCGACGA 3´
OPC 8	5´TGGACCGACGA 3
OPC 9	5´ CTCACCGTCC 3´
OPC 10	5´TGTCTGCGTG 3´
OPA 12	5´ TCGGCGATAG 3´
OPA 16	5´ AGCCAGCGAA 3´
OPA 15	5´ TTCGAGCCAG 3´

6.4.3 Análisis AFLP.

El método AFLP se basó en la metodología propuesta por Vos *et al.* (1995) que consiste básicamente en el corte del ADN genómico y la ligación de adaptadores específicos. Posterior a la digestión del ADN se realizan dos amplificaciones selectivas por PCR. Finalmente, los productos amplificados se separan por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6.5 %. Antes de iniciar el proceso de digestión fue necesario uniformizar la cantidad de ADN presente en cada muestra con la finalidad de obtener una concentración óptima (250 ng mL⁻¹) que permita la buena resolución de las bandas amplificadas. En el proceso de digestión se utilizó una mezcla de reacción de 20 µL que contenía 2 µL de ADN (75 ng µL⁻¹); 1.3 µL de cada una de las endonucleasas EcoRI (Roche®) (10 U µL⁻¹) y Tru 91 (Roche®) (10 U µL⁻¹) y 2 µL de amortiguador RL 10X. Las muestras se incubaron en un termociclador Gene Amp 9700 (Applied Biosystems®) con condiciones de 37 °C por 210 min y 75 °C por 15 min. La mezcla de los fragmentos del ADN se colocó en hielo hasta el momento de la ligación de los adaptadores. A los tubos que contenían los fragmentos de ADN digerido se les aplicó la mezcla de ligación que consistió de 1 µL del adaptador EcoRI (5 pmol), 1 µL del adaptador MseI (50 pmol), 1.2 µL de ATP 10mM, 0.5 µL de buffer RL 10X y 1 µL de T₄ ADN ligasa (Roche®) en un volumen total de 5 µL. La ligación se llevó a cabo en termociclador por 2 h a 20°C. Las mezclas de ligación se almacenaron a -20°C. La mezcla de reacción para la pre-amplificación incluyó 3 µL de la mezcla de ligación diluída 1:5 a la cual se adicionó la mezcla de oligonucleótidos que consistió de 1.5 µL de EcoRI + A (50 ng µL⁻¹) y 1.5 µL de MseI + A (50 ng µL⁻¹) y 2 µL de la mezcla de dNTPs (10 mM). La mezcla de reacción complementaria consistió de 0.2 µL de enzima Taq

ADN polimerasa (Roche®) (5 U) y 2.5 μL de buffer PCR 10X. Las mezclas se combinaron con el ADN ligado por lo que el volumen total de la mezcla de reacción fue de 25 μL .

La mezcla se sometió a amplificación por PCR en termociclador bajo el siguiente programa: 94°C por 60 s y 20 ciclos que incluían las siguientes temperaturas y tiempos: 94°C por 30 s; 56°C por 60 s y 72°C por 60 s. Finalmente, se aplicó un período de extensión final a 72°C por 7 min. Cinco combinaciones de oligonucleótidos selectivos (EcoRI-AGG/MseI-AGA, EcoRI-AAC/MseI-ACA, EcoRI-AGG/MseI-ACA, EcoRI-AGG/MseI-AAG, EcoRI-AAC/MseI-AAG) previamente seleccionadas a partir de la evaluación de nueve combinaciones se utilizaron para el análisis de los ecotipos de teca. Del ADN pre-amplificado se tomaron 4 μL diluidos 1:15 para la mezcla (15 μL) de amplificación selectiva. La mezcla se preparó con la combinación del oligonucleótido EcoRI + 3 (EcoRI + AGG) y el oligonucleótido MseI + 3; ambos con una concentración de 50 ng μL^{-1} , así como una mezcla de dNTPs 10mM; además de Taq ADN polimerasa (5 U μL^{-1}) y amortiguador para PCR 10X. La mezcla de reacción se sometió al siguiente programa de PCR: 94°C por 30 s, 60°C por 30 s y 72°C por 60 s; esto por seis ciclos. Posteriormente, continuó con el siguiente programa: 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 60s durante 23 ciclos. Al terminar los 23 ciclos las muestras se colocaron a -20°C hasta la electroforesis en el gel de poliacrilamida.

La separación de los fragmentos amplificados se realizó en un sistema de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6 % y se visualizaron por tinción con nitrato de plata (Promega®; Madison, EUA). Para la preparación del gel los vidrios se lavaron con agua corriente y se enjuagaron con agua destilada; posteriormente, se limpiaron con etanol absoluto. Al vidrio sin

muestras se aplicó una mezcla de 1 mL de etanol absoluto, 3 μ L de bind silano y 2 μ L de ácido acético glacial; luego, el vidrio se secó durante 5 min. Enseguida, se retiró el exceso de bind silano con etanol absoluto. Al vidrio con muestras se aplicó 1 mL de dimetildiclorosilano en campana de extracción. El gel de acrilamida se preparó con 90 mL de acrilamida 6 %, 554 μ L de persulfato de amonio 10 % y 55 μ L de TEMED®, mismos que se mezclaron y vaciaron en el espacio entre los vidrios empalmados. La separación de los fragmentos amplificados se realizó en geles de 38 x 50 cm, mismos que se pre-corrieron en una cámara de electroforesis Bio Rad (Sequi-Gen®) con amortiguador TBE 1X durante 45 min. A los productos de PCR amplificados se les agregó 4 μ L de amortiguador de carga que consistió en formamida 98 %, azul de bromofenol 0.05 %, xilen-cianol 0.05 % y EDTA 10 mM. Luego, se cargó una alícuota de 4 μ L de cada muestra en cada pozo. La electroforesis se realizó a 2000 V por 3.5 h, aproximadamente.

Para la detección de los productos amplificados se utilizó el Silver Sequence Staining Reagents Kit (Promega®). Los vidrios se separaron después de finalizar la electroforesis y el vidrio que contenía el gel se colocó en una charola donde se agregó 2 L de solución fijadora (ácido acético 10 %) y se agitó lentamente por 20 min en un agitador Orbit Shaker (Lab-Line®) en campana de extracción. La solución de fijado se colectó y se guardó a 4° C. El gel se lavó tres veces con 1.5 L de agua desionizada con agitaciones de 2.5 min. El gel se tiñó con 2 L de nitrato de plata (2 g de AgNO₃, 3 mL de formaldehído) en agitación durante 30 min. Posteriormente, el gel se lavó por seis segundos aproximadamente con 2 L de agua desionizada. En otra charola se colocó 1 L de la solución de revelado (60 g de carbonato de sodio, 3 mL de formaldehído y 400 μ L de tiosulfato de sodio), la charola se agitó colocando el gel y se comenzó a revelar agitando hasta la aparición de las primeras bandas. La

agitación se detuvo y se desechó la solución de revelado. Después, se agregó 1.5 L de la solución de revelado a una nueva charola y se continuó con el revelado bajo agitación constante. La reacción se detuvo cuando aparecieron la mayoría de las bandas en el gel con 1 L de solución de fijado mediante agitación durante 2.5 min. El gel se lavó con 1.5 L de agua desionizada agitando durante 2.5 min y, finalmente, se secó a temperatura ambiente por un día.

6.4.4. Análisis estadístico

6.4.5. Datos AFLP

La lectura de los geles AFLP se efectuó de manera visual y manual empleando un transiluminador con luz fluorescente. Se numeró con uno a la banda de mayor peso molecular y así sucesivamente en orden descendente hasta la banda con menor peso. Para cada combinación se calculó el número de las bandas amplificadas donde se denominó con 1 a la presencia de una banda y con 0 a la ausencia de la misma. Se asumió que dos bandas con el mismo peso molecular en individuos diferentes eran idénticas. La matriz de ceros y unos se utilizó para estimar los coeficientes de apareamiento simple (Nei, 1979) que a su vez sirvieron para estimar las similitudes genéticas entre genotipos. Con la matriz de similitudes se construyó un árbol filogenético y un dendrograma con base en el método “Neighbor-Joining” o del “vecino más cercano” (Felsenstein, 2005). En esta parte del análisis se utilizaron los programas de cómputo Phylip, NJ-Plot y Tree View 1.6.6 (Perdiere y Gouy, 1996; Felsenstein, 2005). Los valores de diversidad se calcularon para cada

ecotipo con base en la distancias genéticas de Nei (1978), donde p es la frecuencia de la banda en los ecotipos y n el número de individuos analizados.

$$h_i = n (1-p) / n-1$$

El valor de diversidad genética para cada combinación AFLP se calculó con base en la estimación de r que es el número de marcadores revelados para cada oligonucleótido. Los valores para una sola población (H) se calcularon con la media h_i ponderado por el valor de todos los marcadores. El valor de diversidad fue también calculado par todo el conjunto de muestras (H_T) con base en el número total de marcadores y los individuos analizados y aplicando la ecuación:

$$H = h_i / r$$

La matriz de similaridades genéticas también se utilizó para realizar un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 2005) como fue descrito por Huff *et al.* (1993) con la ayuda del programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 1997)

La robustez del dendrograma AFLP se evaluó mediante el re-muestreo y generación de 1000 matrices de distancias genéticas generadas a partir de matrices de distancia reconstruidas y reducidas de forma similares como se realizó el análisis de conglomerados original (Nei y Li, 1979; Skroch *et al.*, 1992), de modo que se estimaron los límites de confianza de cada comparación apareada (Felsenstein, 1985). La topología del dendrograma consenso resultante se comparó con la topología del dendrograma original. El análisis de

robustez se realizó con el programa FreeTree (Hampel *et al.*, 2001) y se visualizó con el programa TreeView versión 1.6.6 (Page, 2000).

Finalmente, la estructura de las poblaciones de teca se infirió con base en el uso del algoritmo de agrupamiento con un modelo Bayesiano con el apoyo del programa de cómputo STRUCTURE versión 2.3.1 (Pritchard y Wen, 2000). El programa se corrió considerando K conglomerados genéticos caracterizados con las matrices de frecuencias de alelos. Entonces, se estimó para cada individuo la proporción de su genoma derivado de cada conglomerado genético (proporción de ascendencia). Tres corridas independientes se corrieron con los valores K de 2, 3 y 4 considerando 30,000 repeticiones de Cadenas de Markov-Monte Carlo (CMMC) y 300,000 períodos de rodaje ('burn-in periods'). Para calcular la tasa global de asignación los individuos se asignaron arbitrariamente a un conglomerado genético cuando su proporción de ascendencia en dicho conglomerado fue mayor a 0.8.

7. RESULTADOS

7.1 Análisis de campo.

Todos los ecotipos de teca incluidos en este trabajo provienen de altitudes menores a 100 msnm. Las poblaciones del macro-sitio Guayas – El Oro muestran en general el mayor crecimiento de árboles con excepción del ecotipo del INIAP (Pichilingue) que, al ser presumiblemente la introducción original, es el más antiguo. Por el contrario, los ecotipos de Esmeraldas y Los Ríos – Manabí, con excepción de INIAP (Pichilingue), muestran los menores valores de crecimiento y acumulación de biomasa (Cuadro 3).

Cuadro 3. Origen y parámetros del crecimiento de ecotipos de *T. grandis* del Litoral Ecuatoriano.

Localidad	Parámetros de crecimiento			Volumen total de madera (m ³)
	Altura total (m)	DAP* (m)	Área basal (m ²)	
Macro – sitio: Guayas – El Oro				
Arámbulo	30.7	0.49	0.19	5.87
Tenguel	21.3	0.22	0.04	0.82
Suástegui	31.1	0.44	0.16	5.57
Puerto Cayo	31.5	0.49	0.19	6.05
Macro – sitio: Costa Rica				
Costa Rica	23.6	0.32	0.09	2.00
Macro – sitio: Esmeraldas				
La Unión	14.8	0.18	0.03	0.38
Quinindé	14.0	0.21	0.04	0.47
Macro – sitio: Los Ríos – Manabí				
INIAP	46.5	0.96	0.72	33.60
Ventanas	20.5	0.20	0.03	0.74
Zavala	16.6	0.26	0.05	0.90
Portoviejo	17.5	0.26	0.05	0.97
Pichincha	17.0	0.25	0.05	0.81

* Diámetro a la altura del pecho (1.30 cm)

7.2 Obtención del ADN

El protocolo de Uyemoto (1998) reportó los mejores resultados de aislamiento de ADN de teca con base en su concentración y pureza. La calidad del ADN extraído se evaluó con base en la absorbancia en luz UV donde se observó una pureza de $1.40 \text{ }^{260}/_{280}$, cantidad de $560 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y absorbancia de 0.265 (Figura 3). Al ADN extraído con esta metodología se le hicieron pruebas de digestibilidad y amplificación. Para la amplificación por PCR se incluyeron oligonucleótidos con secuencia arbitraria tipo RAPD. La amplificación con nueve oligonucleótidos RAPD generó 111 bandas en *T. grandis*; que tuvieron alta reproducibilidad y resolución detectándose 28 productos monomórficos y 83 polimórficos (74.9%) (Cuadro 4). El rango de peso molecular de los productos amplificados fue de 0.4 kb a 2.5 kb y el número de productos amplificados por ecotipo de 10 a 14. El porcentaje de marcadores polimórficos varió de 85.7 % para el oligonucleótido OPC9 hasta 64.3 % para OPC4.

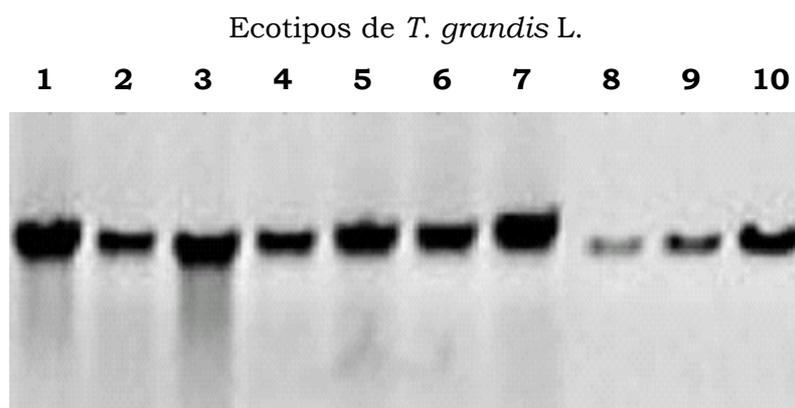


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.2 % del ADN extraído de hojas jóvenes de 10 ecotipos de *T. grandis* del Ecuador con base en el protocolo de Uyemoto (1998)

Cuadro 4. Productos RAPD amplificados con nueve oligonucleótidos decaméricos en diez ecotipos de *T. grandis* L.

Oligonucleótido	Productos Amplificados		Polimorfismo
	Monomórficos	Polimórficos	(%)
OPC 1	4	9	69.2
OPC 4	5	9	64.3
OPC 7	3	8	72.7
OPC 8	3	9	75.0
OPC 9	2	12	85.7
OPC 10	4	10	71.4
OPA 12	2	8	80.0
OPA 15	2	10	83.3
OPA 16	3	8	72.7
Promedio	28	83	74.9

7.3 Análisis AFLP

En el análisis AFLP las cinco combinaciones de oligonucleótidos selectivos amplificaron 286 bandas, 248 polimórficas (87 %) (Cuadro 5). El AMOVA indicó diferencias significativas entre y dentro de poblaciones. Las proporciones de la varianza molecular fueron similares para cada jerarquía analizada; la varianza molecular fue técnicamente similar entre y dentro de poblaciones de tecla (Cuadro 6).

Cuadro 5. Productos amplificados y polimorfismos obtenidos por combinación de iniciadores AFLP en tecla de Ecuador.

Combinación de iniciadores	Bandas Amplificadas	Bandas Polimórficas	Polimorfismo (%)
EcoRI-AGG/MseI-AGA	39	36	92.3
EcoRI-AAC/MseI-ACA	66	60	90.9
EcoRI-AGG/MseI-ACA	54	46	85.2
EcoRI-AGG/MseI-AAG	64	52	81.2
EcoRI-AAC/MseI-AAG	63	54	85.7
Total	286	248	87.0

Cuadro 6. Análisis de varianza molecular de germoplasma de teca del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP.

F.V.	g.l.	SC	Variación (%)	P
Entre Poblaciones	11	1171.01	51.1	<0.0001
Dentro de Poblaciones	41	1122.35	48.9	<0.0001
Total	52	2293.36		

Valor $F_{ST}=0.62$

El análisis filogenético con base en el algoritmo UPGMA diferenció al ecotipo de Costa Rica (COS16) de las poblaciones de teca de Costa Rica y Ecuador (Fig. 3). Todas las combinaciones AFLP mostraron valores de diversidad genética ≥ 0.70 y los valores mayores se detectaron en los ecotipos de Zavala (0.85), Puerto Cayo (0.85) y Portoviejo (0.84), mientras que los menores se observaron en La Unión (0.57), Quinindé (0.60), Tenguel (0.68) e INIAP (0.68). El análisis de conglomerados de los datos AFLP (Figura 2) agrupó a las poblaciones en dos grupos principales: el grupo A incluyó poblaciones de Quinindé, Pichincha, Portoviejo, La Unión, Zavala, Puerto Cayo, Suástegui y Costa Rica. Y el grupo B agrupó a las poblaciones de Tenguel, INIAP, Ventanas y Arámbulo.

Cuadro 7. Índice de diversidad genética por combinación de iniciadores AFLP y por ecotipos en *T. grandis* L. del Litoral Ecuatoriano.

Combinación	Ecotipo												Total
	*1	*2	3*	4*	5*	6*	7*	8*	9*	10*	11*	12*	
EcoRI-AGG/ MseI-AGA	0.79	0.84	0.80	0.70	0.79	0.84	0.88	0.89	0.79	0.83	0.58	0.81	9.51
EcoRI-AAC/ MseI-ACA	0.94	0.88	0.88	0.70	0.97	0.68	0.93	0.77	0.91	0.60	0.64	0.81	9.70
EcoRI-AGG/ MseI-ACA	0.69	0.84	0.81	0.74	0.56	0.75	0.82	0.82	0.79	0.66	0.69	0.77	8.93
EcoRI-AGG/ MseI-AAG	0.78	0.83	0.93	0.56	0.70	0.52	0.77	0.68	0.93	0.30	0.51	0.89	8.41
EcoRI-AAC/ MseI-AAG	0.67	0.85	0.83	0.68	0.76	0.61	0.72	0.76	0.80	0.47	0.60	0.89	8.64
ID													
Diversidad	0.77	0.84	0.84	0.67	0.75	0.68	0.82	0.78	0.84	0.57	0.60	0.83	0.75

*1=Suástegui, 2= Zavala, 3=Puerto Cayo, 4=Tenguel, 5=Arámbulo, 6=INIAP, 7=Ventanas, 8=Pichincha, 9=Portoviejo, 10=La Unión, 11=Quinindé, 12=Costa Rica

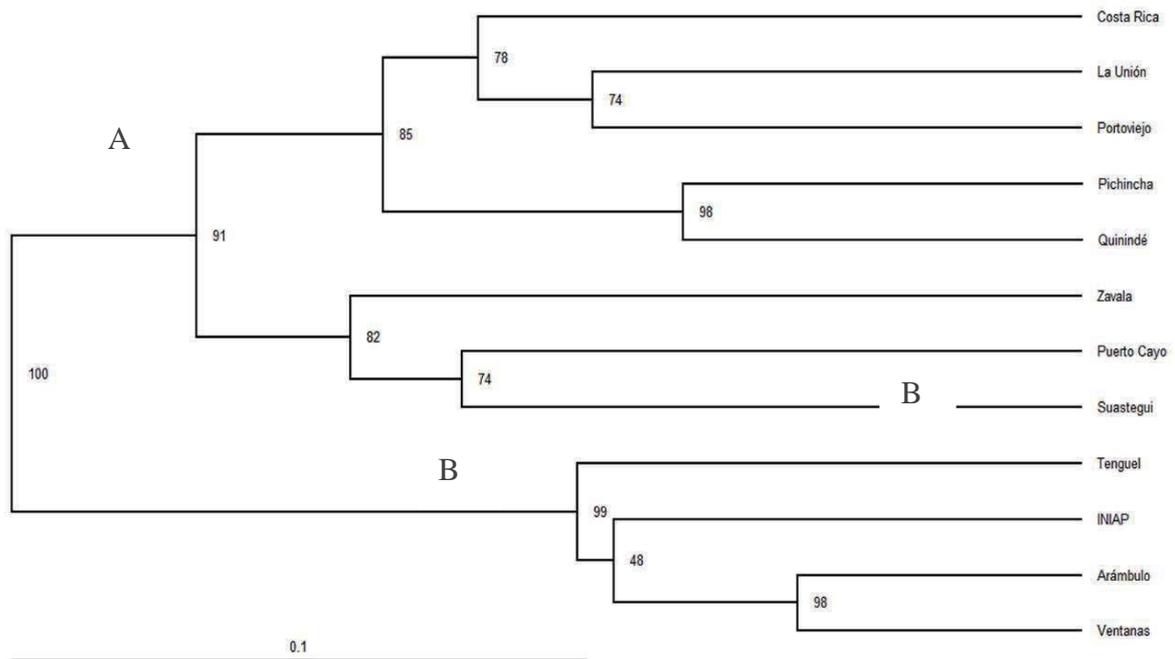


Figura 2. Dendrograma de ecotipos de *T. grandis* L. del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP y el algoritmo UPGMA.

El análisis filogenético del germoplasma de *T. grandis* confirma lo observado en el análisis de conglomerados donde el ecotipo procedente de Costa Rica probablemente origino al resto de germoplasma de teca de Ecuador. Así mismo, los ecotipos de Zavala y Suástegui son altamente parecidos entre si y posiblemente a partir de ellos se originó el resto del germoplasma del Ecuador, con excepción del germoplasma de INIAP y sus ecotipos emparentados (Tenguel, Arámbulo y Ventanas). (Figura 4).

Con $K = 2$ el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano tendió a discriminar las poblaciones del centro-norte del Litoral Ecuatoriano de las del centro-sur incluyendo la población de Costa Rica. Con $K = 3$ el grado de coancestrías entre las poblaciones fue amplio lo que no permite diferenciarlas

en forma clara de acuerdo con su origen geográfico, mientras que con $K = 4$ el análisis separó a las poblaciones de acuerdo con su distribución a lo largo del Litoral Ecuatoriano (norte, centro y sur de la región Costa o Litoral) (Fig. 3).

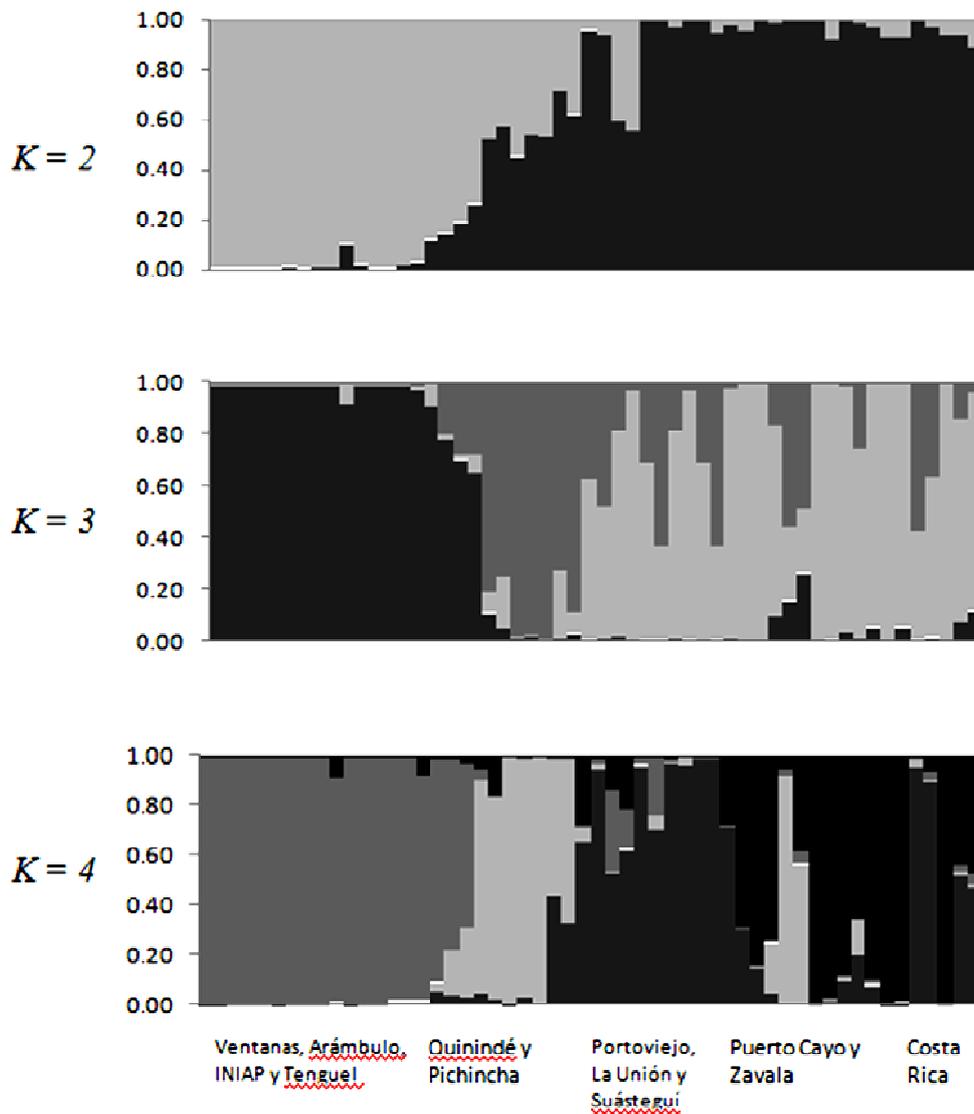


Figura 3. Estructura de poblaciones de *T. grandis* L. del Litoral Ecuatoriano de acuerdo con el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano.

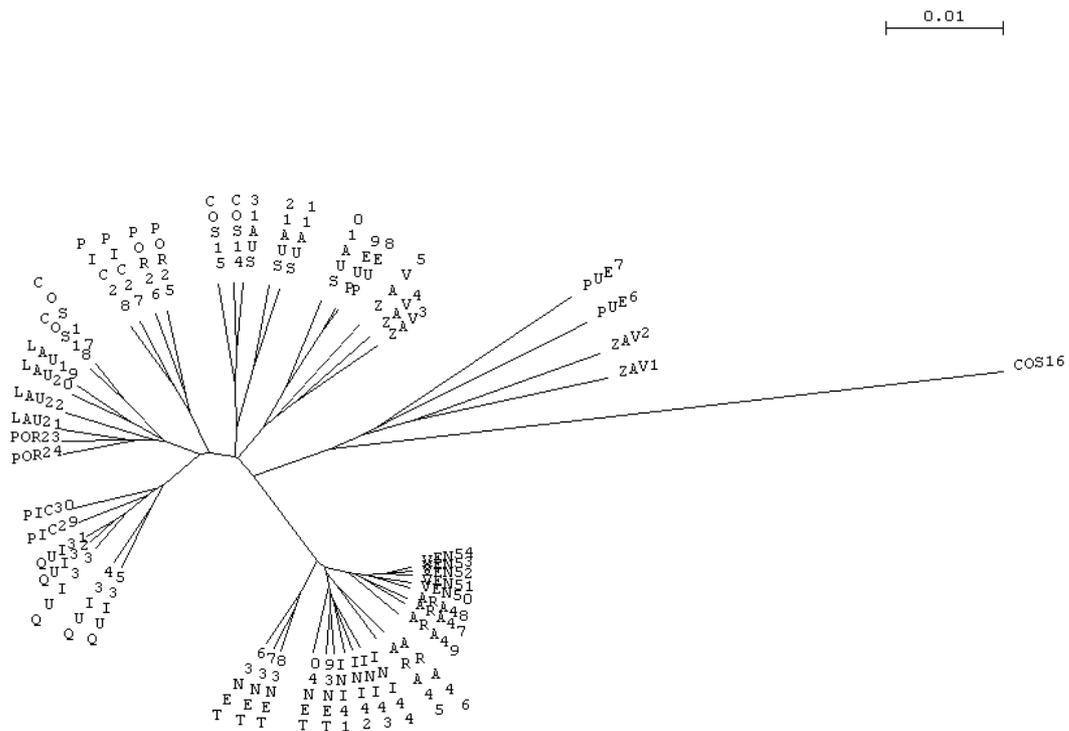


Figura 4. Análisis filogenético de ecotipos de *T. grandis* L. del Litoral Ecuatoriano con base en datos AFLP y el algoritmo del ‘vecino más cercano’ (Neighbor-Joining).

8. DISCUSIÓN

8.1 Aislamiento y amplificación por PCR de ADN de teca

El ADN se aisló de hojas medianamente maduras, pues las jóvenes contienen altas concentraciones de taninos y polisacáridos que dificultan su extracción (Matew, 1998). La extracción del ADN de plantas que contienen grandes cantidades de polifenoles, taninos y polisacáridos ha sido difícil (Webb y Knapp, 1990; Varadarajan y Prakash, 1991). En teca, al igual que en otras plantas existen metabolitos secundarios tales como los polifenoles y los taninos que inhiben la acción enzimática; ya que las enzimas son importantes durante el proceso de extracción y purificación del ADN (Collins *et al.*, 1992). En teca, los polisacáridos fueron evidentes durante la purificación del ADN pues provocaron la textura pegajosa y el aspecto viscoso de la muestra lo que dificultó su manejo. Además, la presencia de dichos metabolitos inhibieron la PCR al impedir la acción de la Taq ADN polimerasa (Colmillo *et al.*, 1992). Otros factores tales como las características del tejido, la calidad de los reactivos, el pH y la concentración de los amortiguadores también influyen en el proceso de extracción del ADN pues modifican la calidad y la cantidad del ADN obtenido en plantas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Por lo anterior, se probaron tres protocolos para la obtención de un ADN de teca libre de impurezas y que fuese fácilmente amplificable mediante PCR para el análisis con técnicas de marcadores moleculares. Phillips *et al.* (1989) indicaron que el aislamiento de ADN altamente polimerizado se dificulta por la presencia en los extractos de las plantas de proteínas, taninos, fenoles, pigmentos y quinonas que forman complejos difíciles de separar. Ello implica la necesidad de evaluar diferentes tipos de amortiguadores para determinar su eficacia para cada especie. Los protocolos de Doyle y Doyle (1987) y Dellaporta (1987)

obtuvieron ADN de teca con problemas de degradación y contaminación con proteínas, pigmentos y sustancias oxidantes tales como compuestos fenólicos. Para contrarrestar estos problemas se utilizó el detergente catiónico CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) en la solución amortiguadora de extracción y se utilizó un sistema con Tris-HCl para mantener el pH constante y así evitar que bajase a niveles óptimos para la acción de enzimas degradadoras del ADN como las ADNasas y lipoxigenasas cuyos pH óptimos van de 6.0 a 7.0. El CTAB formó un complejo con el ADN propiciado por el NaCl que precipitó de manera selectiva al ADN en presencia del isopropanol. El EDTA (ácido etilendiaminotetraacético) capta cationes bivalentes tales como Mg^{2+} y Ca^{2+} que se incluyen para inhibir a las enzimas dependientes de metales, principalmente las ADNasas. De igual forma, al aumentar la cantidad del agente reductor β -mercaptoetanol se protegió más eficientemente al ADN contra la actividad enzimática de las peroxidasas y polifenoloxidasas, desnaturalizándolas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Con el protocolo de Uyemoto (1998) se obtuvo ADN con la mayor calidad y cantidad suficiente para su uso en el análisis con marcadores moleculares. Finalmente, el uso de ARNasa permitió eliminar el abundante ARN presente hasta ese momento en las muestras durante el proceso de extracción. Los resultados concuerdan con lo reportado por Ferreira y Grattapaglia (1998) quienes mencionaron que el exceso de impurezas y la degradación del ADN son causas comunes del fracaso al llevar a cabo análisis RAPD y AFLP en especies vegetales perennes.

Con la finalidad de obtener resultados ideales para su uso en el análisis con marcadores moleculares, las condiciones de amplificación del ADN por PCR debieron optimizarse. En este trabajo, la amplificación se realizó con $MgCl_2$ 50 mM debido a que afecta directamente la eficiencia de amplificación con la Taq ADN polimerasa y, consecuentemente, la intensidad con la cual los fragmentos

amplificados por PCR se visualizan en el gel de electroforesis (Rodríguez y Friz, 1995; Ferreira y Grattapaglia, 1998). La concentración del ADN obtenido también fué un factor determinante en el proceso de amplificación pues causó problemas debido a la gran cantidad del mismo. En la presente investigación se realizaron diluciones 1:50 (5 µL de ADN en 45 µL de TE) de las muestras con concentraciones altas de ADN y se trabajó sin diluir aquellas muestras que tenían concentraciones menores. Nieto *et al.* (2005) sostiene que un factor clave para el análisis RAPD y AFLP es la concentración del ADN ya que las concentraciones altas (mayores a 1000 ng) dificultan la lectura de las bandas en el gel, mientras que las concentraciones bajas (menores a 250 ng) causan la pérdida de bandas importantes que serían visibles en un gel con concentraciones óptimas.

8.2 Análisis AFLP.

La estrategia de análisis AFLP se utilizó en este trabajo en virtud de que ha demostrado previamente su alta eficiencia en la detección de polimorfismos, número de productos amplificados por reacción y eficacia en la detección de diversidad genética de especies forestales tales como *P. oocarpa* (Díaz *et al.*, 2001) y *S. parahybum* (Canchignia-Martínez *et al.*, 2007) en comparación con otras estrategias de genotipificación tales como los RAPDs o los microsatélites. Los AFLP también fueron eficientes para detectar la variación genética del germoplasma de teca con IDs mayores a 0.70, valores superiores a los reportados en especies de *Pinus* (<0.40 en *P. oocarpa*; 0.37 en *P. sylvestris*; 0.46 en *P. contorta*) (Díaz *et al.*, 2001; Szmidt *et al.*, 1996; Thomas *et al.*, 1999) aunque también reflejan la naturaleza genética compleja que muestra la teca en el Litoral Ecuatoriano, posiblemente en constante recombinación y flujo genético y sin barreras que permitan, por ejemplo, el aislamiento reproductivo.

A diferencia de los resultados de Canchingia-Martínez *et al.* (2007) en *S. parahybum*, los AFLPs fueron capaces de identificar al ecotipo aparentemente originario del germoplasma Ecuatoriano de teca. Esto, aunado con los números grandes de marcadores o bandas que se pueden obtener por gel, convierten en efectiva a la técnica para el análisis genético de especies forestales (Karp y Edwards, 1995). Fontes *et al.* (2003) determinaron que las proveniencias de *Pseudotsuga menziesii* (Mirb.) Franco de Portugal no se agruparon claramente con base en el origen geográfico debido a que se utilizó una estrategia de análisis molecular poco informativa (isoenzimas) así como solo siete loci para el análisis. A raíz de ello se sugirió que futuros trabajos incluyeron re-muestreos más intensos así como la utilización de metodologías de marcadores moleculares más poderosas tales como los microsatélites o los AFLPs de modo que se pudieron clarificar las relaciones genéticas entre individuos, poblaciones y/o especies.

En este estudio se incluyeron muestras de plantaciones comerciales de teca con edades variables de modo que no se pudo inferir sobre el posible flujo de germoplasma ni sobre posibles patrones de diferenciación entre germoplasma comercialmente explotado y el germoplasma 'nativo' o no aprovechado comercialmente. La distancia genética entre individuos dentro de proveniencias fue baja y las poblaciones de cada sitio de colecta se agruparon con los individuos originarios de sitios cercanos. Esto indica el alto grado de parentesco entre dichos individuos (Chung *et al.*, 2004). Además, el AFLP dividió al germoplasma en dos sub-grupos, uno genéticamente cercano a la población de teca que se supone fue la originalmente introducida al Ecuador en Pichilingue (Ventanas, Arámbulo y Tenguel) y el resto a las poblaciones originales que bien pudieron haberse introducido a partir de Zavala y Puerto Cayo. Estas dos poblaciones son, además, las más diversas genéticamente;

mientras que las de INIAP y Tenguel están entre las menos diversas. La menor diversidad de teca de Tenguel se podría deber probablemente al origen estrecho del germoplasma así como también a la edad de los árboles analizados (< 12 años). Algo similar ocurre con el origen estrecho del germoplasma en La Unión y Quinindé (macro – sitio de Esmeraldas) donde se plantaron en ambos sitios árboles altamente endogámicos o altamente emparentados con buen desarrollo en otras regiones o macro – sitios cercanos. Rivera-Ocasio *et al.* (2002) analizaron poblaciones de *Pterocarpus officinalis* de Sudamérica, Centroamérica y el Caribe. La mayor diversidad genética se detectó en las poblaciones continentales (Venezuela) y, a medida que se alejó el muestreo y análisis de poblaciones del continente a través de las islas del Caribe, la diversidad genética se redujo. Esta reducción en el grado de diversidad genética permitió definir tanto el sitio de introducción original de la especie exótica al Continente Americano como el probable patrón de diseminación a través del mismo. Algo parecido se puede inferir a partir de nuestros resultados para poder sugerir el probable sitio de introducción y los posibles patrones de diseminación de la teca en Ecuador. Nuestros resultados sugieren que deben considerarse al menos dos sitios de introducción y dispersión (INIAP y Zavala y Puerto Cayo) y que, a partir de los mismos, la teca se diseminó en forma de semillas para el establecimiento de las plantaciones comerciales actuales. Incluso, las poblaciones menos diversas del macro – sitio Esmeraldas son las más jóvenes y con menor crecimiento vegetativo, de modo que en estos casos los fenotipos probablemente son altamente homocigóticos y homogéneos dado que se han plantando recurrentemente por aproximadamente 50 años (Salvador *et al.*, 2000; Ho *et al.*, 2002; Ribeiro *et al.*, 2002; Fontes *et al.*, 2003).

Los resultados del análisis genético también permiten sugerir que los programas de plantación de teca en Ecuador se han llevado a cabo utilizando

plantas derivadas de las introducciones originales procedentes de Costa Rica, tanto en su forma documentada al INIAP de Pichilingue como las no documentadas completamente en Zavala y/o Puerto Cayo. El establecimiento de nuevas plantaciones forestales demanda la producción cada vez mayor de semillas. Las semillas frecuentemente se transportan entre países o entre áreas dentro de países y, generalmente, no se cuenta con la información suficiente acerca de su origen e historia. Por tanto, la identificación del material reproductivo así como su certificación se mantienen como retos importantes de la producción forestal tropical hasta la actualidad (Jones y Burley, 1973).

El análisis del germoplasma de teca con base en marcadores moleculares de ADN puede considerarse una herramienta útil para la conservación de la especie en Ecuador. En teoría, el germoplasma analizado en este trabajo podría considerarse como la base para el desarrollo, en el corto y mediano plazos de un programa de mejoramiento genético para la producción de nuevos genotipos con tolerancia a estrés biótico y/o abiótico así como buenos niveles de adaptación a través de las regiones forestales del país y con mejor calidad de madera y de rendimiento de la misma (Thomas *et al.*, 1999). Debe reconocerse, sin embargo, que la utilización de semillas con orígenes geográficos distintos puede contribuir a las diferencias en crecimiento y al incremento de la variación en las características fenotípicas entre y dentro de ecotipos en un mismo sitio. Dichas diferencias podrían ser favorables para el establecimiento exitoso de nuevas plantaciones, diversas fenotípica y genéticamente, pero con mayor probabilidad de mostrar mayor adaptabilidad a las condiciones ambientales y de producción variables y/o adversas (Martínez de Lara *et al.*, 2004).

9. CONCLUSIONES

ADN de buena calidad y cantidad de teca se obtuvo con el protocolo de Uyemoto (1998) lo que permitió su utilización en la obtención marcadores moleculares RAPD y AFLP.

Existe diferenciación genética significativa ($F_{ST}=0.62$) entre los ecotipos de teca establecidos en Ecuador y también al interior de cada uno de ellos.

Con el uso de los marcadores moleculares AFLP para el análisis genético de teca se demostró la amplia diversidad genética del germoplasma producto de la probable recombinación sexual recurrente dentro de la especie.

10. RECOMENDACIONES

La técnica AFLP fue una metodología que presentó robustez en el análisis genético de germoplasma de teca; sin embargo, es necesario complementar este trabajo con otras técnicas como los microsatélites que ofrecen como ventajas la definición de parentescos y de las estructuras genéticas de las poblaciones de teca de interés.

Se propone realizar un nuevo estudio del germoplasma de teca incluyendo otros ecotipos y aumentando el número de muestras por población con la finalidad de obtener resultados más confiables y robustos y tener una idea real de la diversidad genética de toda la teca establecida en Ecuador

De igual manera, se sugiere realizar un análisis de caracteres morfológicos en teca en condiciones de campo para correlacionarlos con los datos genéticos.

11. BIBLIOGRAFIA

- AHUJA, M.R. (2001).** Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* 121: 173-195.
- BETANCOURT A. (1987).** *Silvicultura Especial de Arboles Maderables Tropicales*. Cuba. Editorial Científico-Técnica. La Habana. pp. 342-356 .
- BUTCHER, P., GLAUBITZ, J. and MORAN, G. (2003).** Applications for microsatellite markers in the domestication and conservation of forest trees. *Forest Genetic Resources* 27: 34-42.
- CABALLERO, S., HAMILTON H., JARAMILLO H., CAPELLA C., FLÓREZ-GONZÁLEZ J., OLAVARIA L., ROSEMBAUM C., GUHL F. and BAKER S. (2001).** Genetic characterization of the Colombian Pacific coast humpback whale population using RAPD and mitochondrial DNA sequences. *Memoirs of the Queensland Museum* 47: 459-464.
- CANCHIGNIA-MARTINEZ, H. F., S HERNANDEZ-DELGADO, M. GONZALEZ-PAZ, E. MOTTE and N. MAYEK-PÉREZ (2007).** Genetic relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) ecotypes from Ecuador and other countries. *Silvae Genetica* 56: 214-221
- CENTENO J.C. (1997).** The management of teak plantations. Mérida, Venezuela. Disponible en www.tremail.nl/teakscan.dal/files/mngteak.htm (Fecha de consulta, agosto de 2008).

- CHUNG, M.Y., M.G. CHUNG, E.R. MYERS, J.M. CHUNG, K.J. KIM, C.W. PARK, B.Y. SUN and J.H. PARK (2004).** Spatial genetic structure in distributed populations of *Quercus acuatissima* (Fagaceae). *Silvae Genetica* 53: 206-211
- COLLINS, G. G. and SYMONS R. H. (1992)** Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Molecular Biology Reporter* 10: 233.235
- DE LA TORRE, A., LÓPEZ, C., IGLESIAS, E. and CORNELIUS, J.P., (2008).** Genetic (AFLP) diversity of nine *Cedrela odorata* populations in Madre de Dios, southern Peruvian Amazon. *Forest Ecology and Management* 255: 334–339.
- DELLAPORTA, SJ, WOOD J. and HICKS JV. (1983).** A plant DNA minipreparation. Version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1: 19-21.
- DÍAZ, V., MUÑIZ L. and FERRER E. (2001).** Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaragua populations of *Pinus oocarpa*. *Plant Molecular Biology Reporter* 10:2593-2603.
- DOYLE J.J. and DOYLE J.L. (1987).** A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- EXCOFFIER, L., LAVAL, G., and SCHNEIDER, S. (2005).** Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1: 47-50.

- FELSENSTEIN, J. (2005).** PHYLIP (Phylogeny Inference Package) version 3.6. Distributed by the author. Department of Genome Sciences, University of Washington, Seattle, Washington (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip/software.html>).
- FERREIRA, M. and GRATTAPAGLIA, D.. (1998).** Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia. 218 p.
- FONTES, L., SAVILL, P. and HARRIS, S. (2003).** Identification of the origin of Portuguese Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii* Mirb) provenances. *Silvae Genetica* 52: 266-273.
- GOH, D. and MONTEUUIS O. (1997).** Vegetative propagation of teak. *Tropical Forest Update* 7: 12-13.
- GONZALES, M. y SIMPSON, W. (1997).** Diversidad genética en hongos. Departamento de Ingeniería Genética. Centro de Investigación y de Estudios Avanzados Unidad Irapuato. Tópicos selectos en Fitopatología: Genética Molecular. Irapuato, México. p. 52.
- GONZÁLEZ-ASTORGA, J., VOVIDES, A.P. and IGLESIAS, C. (2003).** Morphological and geographical variation of the cycad *Dioon edule* Lindl. (Zamiaceae): ecological and evolutionary implications. *Botanical Journal of the Linnean Society* 141: 465-470.
- HAMRICK, J. L. and GODT M. J. (1989).** Allozyme diversity in plant species. *In*: Brown, A. H. D., M. T. Clegg, A. L. Kahler and B. S. Weir (eds), *Plant Population Genetics, Breeding and Germplasm Resources*. Sinauer, Sunderland, USA. pp. 43-63

- HO, K. Y., OU, C.H., YANG J.C. and HSIAO J.Y. (2002).** An assessment of DNA polymorphisms and genetic relationships of *Casuarina equisetifolia* using RAPD markers. Botanical Bulletin of Academia Sinica 43: 93-98.
- HUFF D., PEAKALL R., and SMOUSE E. (1993).** RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchöe dayloides* (Nutt.) Engelm]. Theoretical and Applied Genetics 86: 927-934.
- IGLESIAS, L. y GARCIA J. (1999).** Principales avances en el estudio de la diversidad genética de árboles mediante el uso de marcadores moleculares. Foresta Veracruzana 1: 51-56.
- JONES, N. and BURLEY C. (1973).** Seed certification, provenance nomenclature and genetic history in forestry. Silvae Genetica 22: 53-58.
- KARP, A. and EDWARDS, K. J. (1995).** Techniques for the analysis, characterization and conservation of plant genetic resources. In: Molecular Genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI workshop 9-11. W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat & V.R. Rao, (eds).October 1995. Rome, Italy. p:3-22
- LITTLE, E. Y DIXON, R. (1983).** Árboles Comunes de la Provincia de Esmeraldas. Esmeraldas, Ministerio de Agricultura y Ganadería. Quito, Ecuador. 502 p.
- MARTINEZ DE LARA J., BARRIENTOS L., REYES M., HERNANDEZ, S., PADILLA, S. y MAYEK N. (2004).** Diversidad fenotípica y

genética de huertas de guayabo de Calvillo, Aguascalientes.

Revista Fitotecnia Mexicana 27: 243-249

MATTHEW D., DAVEY M., BRIAN J., LOWE K., BLIGH F., ROACH S.

and JONES C. (1998). DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.). Plant Molecular Biology Reporter 16: 49–59.

MULLIS KB and FALOONA FA. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods in Enzymology **155**: 335–350.

NEALE, D. and SEDEROFF, R. (1991) Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. Theoretical and Applied Genetics **77**: 212–216

NEI and LI, WH. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 76: 5269-5273.

NUEZ, F. Y CARRILLO, J. M. (2000). Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España. pp. 25 - 27.

PERRIÈRE, G. and GOUY, M. (1996). WWW-Query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. Biochimie 78: 364-369.

PHILLIPS- MORA, W. RODRÍGUEZ H. and FRITZ P., (1995). Marcadores de AND: Teoría aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos e investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). San José, Costa Rica. Serie Técnica. Informe No. 252. 185 p.

- RIBEIRO, M., LE PROVOST, G., GERBER, S., VENDRAMIN, G., ANZIDEI, M., DECROOQ, S., MARPEAU, A., MARIETTE, S. and PLOMION, C. (2002)** Origin identification of maritime strands in France using chloroplast simple-sequence repeats. *Annals of Forest. Science* 59:53-62
- RIVERA-OCASIO, E., AIDE T. and Mc MILLAN O. (2002).** Patterns of genetic diversity and biogeographical history of the tropical wetland tree, *Pterocarpus officinales* (Jacq.), in the Caribbean basin. *Molecullar Ecology* 11: 675-677
- SALVADOR, L., ALÍA, R., AGÚNDEZ, D. and GIL L. (2000).** Genetic variation and migration pathways of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait) in the Iberian Peninsula. *Theoretical and Applied Genetics* 100: 89-95
- SAIKI, T., KOBAYASHI, Y., KAWAGOE, K, and BEPPU, T. (1985).** *Dictyoglomus thermophilum* gen. nov. sp. nov. a chemoorganotrophic, anaerobic, thermophilic bacterium. **International Journal of Systematic Bacteriology** 35:253-259.
- SCHNEIDER, S., KUEFFER, J. M., ROESSLI, D., and EXCOFFIER, L. 1997.** Arlequin version 1.1: A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Geneva, Switzerland.
- SZMIDT, A., WANG X. and LU M. (1996)** Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* 76: 412-420

- THOMAS, S., MCDONALD, E., HICKS, M., ADAMS, D. and HODGETTS, R. B. (1999).** Effects of reforestation methods on genetic diversity of lodgepole pine: an assessment using microsatellite and randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 98: 793-801
- TONON, G., KEVERS, C., FAIVRE-RAMPANT, O., GRAZIANI, M. and GASPAR, T. (2004).** Effect of NaCl and mannitol iso-osmotic stresses on proline and free polyamine levels in embryogenic *Fraxinus angustifolia* callus. *Journal Plant Physiology* 161: 701-708,
- TROUP, R. S. (1932).** *Exotic Forest Trees in the British Empire.* Clarendon. University Press, Oxford. 259 p.
- UYEMOTO, J. K., ZHANG Y. P. and KIRKPATRICK B. C. (1998).** A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods* 23: 312-316.
- VARADARAJARAN, G. S., and PRAKASH, C. S. (1991)** A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Molecular Biology Reporter* 9: 6-12
- VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., and ZABEAU, M. (1995).** AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

- WEAVER P.L. (1993).** *Tectona grandis* L.f., teak. Res. Note SO-ITF-SM-64. New Orleans: USDA Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 18 p.
- WEBB, D. M., and KNAPP, S.J. (1990).** DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Plant Molecular Biology Reporter* 8: 180-185
- WHITE, G. and POWELL, W. (1997).** Isolation and characterisation of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology* 6: 851-860
- WILLIAMS J.G.K, LIVAK K, RAFASKI J. and TINGEY, S. (1990).** DNA polymorphic amplified by arbitrary primers are usefull as genetic markers *Nucleid Acids Research* 18: 341-345.

12. GLOSARIO

Ácidos nucleicos: biomoléculas formadas por macropolímeros de nucleótidos, o polinucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia que se transmite de una a otra generación. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico (ADN) y el ácido ribonucleico (ARN).

Alelos: cada uno de los dos genes presentes en el mismo lugar (locus) del par de cromosomas homólogos. Uno de los diferentes estados alternativos del mismo gen.

Aminoácido: molécula orgánica que contiene los grupos amino y carboxilo. Son los monómeros de las proteínas. De su diversidad como del enorme número de combinaciones y longitudes resulta la enorme variedad de proteínas existentes.

Aminoácido esencial: aminoácido que no puede ser sintetizado por el propio organismo.

Biodiversidad: conjunto de todas las especies de plantas y animales, su material genético y los ecosistemas de los que forman parte.

Biología: ciencia que estudia los seres vivos y los fenómenos vitales en todos sus aspectos.

Biología Molecular: parte de la biología que trata de los fenómenos biológicos a nivel molecular. En sentido restringido comprende la interpretación de dichos fenómenos sobre la base de la participación de las proteínas y ácidos nucleicos.

Biomoléculas: elementos arquitectónicos básicos de los seres vivos, antiguamente llamados principios inmediatos. Las biomoléculas inorgánicas son sobretodo agua, sales minerales y gases como oxígeno y dióxido de carbono. Los grupos de compuestos orgánicos exclusivos de los seres vivos son cuatro: glúcidos, lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

Biotecnología: toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos en usos específicos.

Carácter: rasgo distintivo como expresión de un gen.

Célula: unidad de estructura y funcional de plantas y animales que consta típicamente de una masa de citoplasma que encierra un núcleo (excepto en procariontes) y limitada por una membrana diferencialmente permeable.

Células sexuales: células que al unirse forman el huevo fertilizado. En la especie humana los gametos o células sexuales son el espermatozoide (masculino) y el óvulo (femenino).

Clones: grupo de células o de organismos de idéntica constitución genética entre sí y con el antepasado común del que proceden por división binaria o por reproducción asexual.

Conjugación: uno de los procesos naturales de transferencia de material genético de una bacteria a otra, junto con la transducción y la transformación, realizado por contacto entre ellas.

Ecología: ciencia que estudia las interacciones entre los seres vivos y con su medio ambiente.

Ecosistema: complejo dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos y su medio no viviente que actúan entre sí como una unidad funcional.

Enzima: catalizador biológico, normalmente una proteína, que mediatiza y promueve un proceso químico sin ser ella misma alterada o destruida. Son catalizadores extremadamente eficientes y muy específicamente vinculados a reacciones particulares.

Especie: clasificación taxonómica formada por el conjunto de poblaciones naturales que pueden cruzarse entre sí real o potencialmente.

Fenotipo: conjunto de todos los caracteres aparentes expresados por un organismo, sean o no hereditarios.

Gen: unidad física y funcional del material hereditario que determina un carácter del individuo y que se transmite de generación en generación. Su base material la constituye una porción de cromosoma (locus) que codifica la información mediante secuencias de ADN.

Genética: ciencia que trata de la reproducción, herencia, variación y el conjunto de fenómenos y problemas relativos a la descendencia.

Genoma: conjunto de todos los genes de un organismo, de todo el patrimonio genético almacenado en el conjunto de su ADN o de sus cromosomas.

Genotipo: constitución genética, de uno o más genes, de un organismo en relación a un rasgo hereditario específico o a un conjunto de ellos.

Germoplasma: la variabilidad genética total, representada por células germinales.

Hereditario: que se transmite de generación en generación.

Loci: plural de locus.

Locus: en genética, sitio de un cromosoma ocupado por un gen.

Material genético: todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia.

Péptido: polímero o cadena de aminoácidos.

Protocolo: documento de normalización que establece su justificación, los objetivos, el diseño, la metodología y el análisis previsto de los resultados así como las condiciones bajo las que se realizará y desarrollará.

Reacción en cadena de polimerasa (PCR) : Técnica de análisis del genoma mediante la amplificación ilimitada de porciones específicas del ADN, aunque sean minúsculas. Es un método revolucionario de amplificación exponencial del ADN por la intervención de una enzima termoestable, la Taq polimerasa.

Recombinación genética: redistribución genética. *In vitro* entre fragmentos de ADN de orígenes diferentes o no contiguos. *In vivo* entre copias homólogas de un mismo gen (manipulación cromosómica), o como resultado de la integración en el genoma de un elemento genético (trasposón, profago o transgén).

Replicación: proceso por el que una molécula de ADN o ARN origina otra idéntica a la preexistente. En general, duplicación del ácido nucleico.

Secuencia de ADN: orden de encadenamiento de las bases nitrogenadas de los nucleótidos que constituyen el ADN y que cifra toda la información genética. Cuando es codificante (exón), define el orden de los aminoácidos que forman la proteína correspondiente.