



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**TRABAJO DE TITULACIÓN, PREVIO A LA OBTENCIÓN DEL
TÍTULO DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**TEMA 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)**

AUTOR: TAFUR SALAZAR, DANNY JEFFERSON

DIRECTORA: PhD. SEGOVIA SALCEDO, MARÍA CLAUDIA

SANGOLQUÍ

2017

CERTIFICACIÓN



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “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)” realizado por el señor TAFUR SALAZAR DANNY JEFFERSON, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo que cumple con los requisitos teóricos, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señor TAFUR SALAZAR DANNY JEFFERSON para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, 23 de Febrero del 2017


MARÍA CLAUDIA SEGOVIA SALCEDO PhD.

DIRECTORA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA****CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA****AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD**

Yo, **TAFUR SALAZAR DANNY JEFFERSON**, con cédula de identidad N° 1719775072, declaro que este trabajo de titulación **“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)”** ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existentes, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográficas.

Consecuentemente declaro que este trabajo es de mi autoría, en virtud de ello me declaro responsable del contenido, veracidad y alcance de la investigación mencionada.

Sangolquí, 23 de Febrero del 2017


DANNY JEFFERSON TAFUR SALAZAR

C.C. 1719775072

AUTORIZACIÓN**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA****CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA****AUTORIZACIÓN**

Yo, **TAFUR SALAZAR DANNY JEFFERSON**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación **“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)”** cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad.

Sangolquí, 23 de Febrero del 2017

DANNY JEFFERSON TAFUR SALAZAR

C.C. 1719775072

DEDICATORIA

A Dios, por ser mi fortaleza y esperanza en tiempos difíciles de mi vida.

A mi madre, por ser el pilar más importante.

A mi hermana, por su cariño incondicional

A mi padre, a pesar de nuestra distancia física, está siempre conmigo.

AGRADECIMIENTO

Por el presente trabajo de tesis, agradezco a Dios a mi madre y hermana por su apoyo incondicional.

El trabajo realizado se dio gracias a la colaboración del equipo del laboratorio de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, que en esas instancias se encontraba como jefa la Bióloga Katherine Orbe.

Agradezco también a mi Directora de tesis, Doctora Claudia Segovia por la guía en el sendero de la investigación y en cimentar un pilar fundamental en mi formación.

Expreso mi agradecimiento especial a la Ingeniera Johanna Buitrón por su enseñanza, consejos y amabilidad al inicio y al final del Proyecto de tesis.

Un agradecimiento al equipo de la Estación Experimental Litoral Sur al Ingeniero Limongi por su aporte en este proyecto.

A mis amigos que se encontraban ahí en los momentos difíciles y a mis compañeros del INIAP, por su amistad y apoyo.

ÍNDICE

CERTIFICACIÓN	I
AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD	II
AUTORIZACIÓN	III
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTO	V
ÍNDICE	VI
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS	XII
RESUMEN	XV
ABSTRACT.....	XVI
1 CAPÍTULO I INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Formulación del problema	1
1.2 Justificación.....	2
1.3 Objetivos de la Investigación	4
1.3.1 Objetivo General	4
1.3.2 Objetivos específicos.....	4
1.4 Marco referencial	4
1.4.1 Taxonomía.....	4
1.4.2 Descripción Botánica	5
1.4.2.1 Descripción de las flores	5
1.4.2.2 Descripción de las hojas	6
1.4.2.3 Descripción de los frutos.....	7
1.4.2.4 Descripción de las semillas	7
1.4.2.5 Descripción del tronco	8
1.4.2.6 Descripción de la copa	8
1.4.2.7 Descripción de la raíz.....	9
1.4.2.8 Descripción de la corteza	10
1.4.3 Reproducción natural y asistida de melina.....	10

1.4.4	Distribución de la especie	11
1.4.5	Características edafoclimáticas	11
1.4.6	Requerimientos edáficos	12
1.4.7	Incremento medio anual de biomasa.....	12
1.4.8	Turno o rotación	14
1.4.9	Propiedades de la madera.....	14
1.4.9.1	Organolépticas.....	14
1.4.9.2	Físicas y mecánicas	14
1.4.10	Marcadores ISSR.....	15
1.4.10.1	Ventajas y desventajas de los ISSR.....	17
1.4.11	Genética de poblaciones.....	17
1.4.11.1	Diversidad genética de Nei (1973).....	18
1.4.11.2	Polimorfismo.....	18
1.4.11.3	Ley de Hardy – Weinberg	19
1.4.11.4	Frecuencia alélica para marcadores ISSR	19
1.4.12	Estadísticos F.....	20
1.5	Hipótesis.....	21
2 CAPÍTULO II MATERIALES Y MÉTODOS		22
2.1	Participantes	22
2.1.1	La institución.....	22
2.1.2	Responsable del proyecto.....	22
2.1.3	Colaboradores.....	22
2.2	Fase I: Procedencia del material vegetal	23
2.2.1	Procedencia del material vegetal mediante coordenadas UTM (Universal Transversal de Mercator).....	23
2.3	Fase II: Caracterización molecular.....	23
2.3.1	Características del laboratorio.....	23
2.3.2	Ubicación geográfica.....	23
2.3.3	Recolección de muestras	25
2.3.4	Procesamiento de muestras	25

2.3.5	Extracción de ADN	25
2.3.6	Cuantificación de ADN	26
2.3.6.1	Gel de agarosa	26
2.3.6.2	Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch TM de BioTeck.....	27
2.3.7	Validación de ADN	27
2.3.8	Amplificación de la colección de <i>G. arborea</i> con marcadores ISSR	28
2.3.9	Electroforesis y visualización.....	30
2.3.10	Genotipaje de las muestras de melina en el programa TotalLab 1D	31
2.4	Análisis de datos.....	33
2.4.1	Diversidad genética	33
2.4.2	Análisis de agrupamiento	34
2.4.3	Análisis de coordenadas principales	34
2.4.4	Análisis molecular de varianza	34
2.4.5	Distancia genética de Nei.....	35
3 CAPÍTULO III RESULTADOS.....		36
3.1	Procedencia del material vegetal.....	36
3.2	Caracterización molecular.....	37
3.2.1	Muestras analizadas.....	37
3.2.2	Extracción y cuantificación de ADN	37
3.2.3	Validación de ADN con el primer 824.....	38
3.2.4	Pre-selección de ADN con <i>primers</i> ISSR	38
3.3	Optimización de la Técnica de PCR	41
3.3.1	Concentración de MgCl ₂	41
3.3.2	Temperatura de alineamiento	43
3.4	Amplificación de ADN de melina (<i>G. arborea</i>) mediante los <i>primers</i> ISSR seleccionados	44
3.5	Análisis de datos de toda la colección.....	47

3.5.1	Diversidad genética	47
3.6	Análisis de agrupamiento de los Subgrupos	50
3.6.1	Diversidad genética entre los subgrupos	54
3.7	Métodos multivariados	56
3.8	Estadística F	60
3.9	Análisis Molecular de varianza	60
3.10	Identificación de duplicados.....	65
4.CAPÍTULO IV DISCUSIÓN.....		66
4.1	Extracción de ADN	66
4.2	Calidad del ADN genómico	67
4.3	Validación del ADN de melina	67
4.4	PCR con el uso de marcadores ISSR	68
4.5	Amplificación.....	69
4.6	Análisis de la diversidad genética para toda la colección	70
4.7	Análisis de agrupamiento y la diversidad genética de los subgrupos	72
4.8	Análisis molecular de varianza	74
4.9	Identificación de duplicados de la colección de <i>G.</i> <i>arborea</i>	75
5 CAPÍTULO V CONCLUSIONES.....		76
6 CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES.....		78
7 CAPÍTULO VII BIBLIOGRAFÍA		79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1:	Requerimientos ambientales para el óptimo crecimiento de melina.	12
Tabla 2:	Clasificación de sitios para la región del Pacífico Sur.	13
Tabla 3:	Clasificación de lugares fértiles según el Incremento Medio Anual (IMA) para melina.....	13
Tabla 4:	Propiedades físicas y mecánicas de <i>G. arborea</i>	15
Tabla 5:	Datos georeferenciales de la ubicación de los laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología.....	24
Tabla 6:	Características Meteorológicas de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.....	24
Tabla 7:	Coctel de amplificación para la validación empleando un marcador ISSR.....	27
Tabla 8:	Programa de amplificación, marcadores ISSR.....	28
Tabla 9:	<i>Primers</i> ISSRs seleccionados para el estudio con <i>G. arborea</i> y condiciones óptimas, Y= C ó T, R= A ó G.	29
Tabla 10:	Coctel de amplificación para marcadores ISSRs.....	30
Tabla 11:	Programa de amplificación, marcadores ISSR.....	30
Tabla 12:	Tabla de bandas como resultado del análisis del software TotalLab 1D versión 14.0.....	33
Tabla 13:	<i>Primers</i> pre-seleccionados para amplificar toda la colección.....	41
Tabla 14:	Variaciones en la concentración del MgCl ₂ , en el coctel de la PCR según el protocolo de Rigotti <i>et al.</i> , (2002) con modificaciones.....	42
Tabla 15:	Marcadores ISSR seleccionados y sus concentraciones de MgCl ₂ escogidos.....	43
Tabla 16:	Temperaturas de <i>annealing</i> de los marcadores ISSR en la amplificación del ADN de melina.	44

Tabla 17:	Detalle de <i>primers</i> : números de alelos y rangos de pares de bases.....	48
Tabla 18:	Frecuencias alélicas promedio de los marcadores ISSR.	49
Tabla 19:	Análisis de la diversidad genética de <i>G. arborea</i> con los 11 marcadores ISSRs.....	50
Tabla 20:	Diversidad genética en los subgrupos de <i>G. arborea</i> estimadas utilizando los datos de los ISSR de 214 <i>loci</i> en los 3 subgrupos formados.....	55
Tabla 21:	Agrupación de los Subgrupos.....	56
Tabla 22:	Matriz de distancia que representa las distancias genéticas entre los diferentes subgrupos de <i>G. arborea</i>	56
Tabla 23:	Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza para las tres primeras coordenadas, de la colección de melina.	57
Tabla 24:	Índice de diferenciación (F_{st}) en cada relación de Subgrupos encontrada.	60
Tabla 25:	Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A, B y C con los 11 marcadores ISSRs.....	62
Tabla 26:	Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A y B con los 11 marcadores ISSR.	63
Tabla 27:	Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A y C con los 11 marcadores ISSR.	64
Tabla 28:	Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas B y C con los 11 marcadores ISSR.....	65
Tabla 29:	Identificación de duplicados de la colección de <i>G. arborea</i>	65

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Flores de melina.	6
Figura 2:	Hojas de árboles de melina.	6
Figura 3:	Fruto de melina.	7
Figura 4:	Fruto de melina.	8
Figura 5:	Tronco melina.	8
Figura 6:	Copa de melina.	9
Figura 7:	Tipos de raíces que adopta melina.	9
Figura 8:	Corteza de melina.	10
Figura 9:	Distribución geográfica natural de melina.	11
Figura 10:	Primer (CA) _N fijado en el extremo 5' con un codón de inicio. Se amplifica exponencialmente la parte intermedia del ADN entre dos microsatélites invertidos.	16
Figura 11:	Evaluación de las bandas presentes en un gel para el cálculo de las frecuencias alélicas.	20
Figura 12:	Cuantificación de bandas de melina, mediante el software TotalLab 1D versión 14.0.	32
Figura 13:	Ubicación mediante de las muestras de melina de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS-INIAP) cantón Yaguachi, provincia del Guayas utilizadas en este estudio. Mapa generado, con el software DIVA-GIS versión 7.5.	36
Figura 14:	Ubicación de las muestras de melina de la Estación Experimental Litoral Sur, análisis realizado con el software DIVA-GIS versión 7.5. Se muestra tres Subgrupos: A de color rojo, B de color azul y C de color amarillo; la muestra testigo pertenece al subgrupo A, con una distancia de 1Km.	37
Figura 15:	Validación del material genético de melina con el marcador 824 (Carril Kb: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA Ladder de Invitrogen™). a) Gel agarosa al 2% muestras no amplificadas (1-5-13-15-17-19) (ver	

	anexo 3). b) Gel de agarosa al 2% con la validación completa de las muestras de melina.	38
Figura 16:	Amplificación de ADN de melina con 11 marcadores ISSR: 807, 811, 812, 815, 835, 836, 844, 848, 849, 873, HB12, luego del nombre del marcador - la concentración, además en el marcador ISSR HB12 se adicionó la temperatura de <i>annealing</i>	40
Figura 17:	Amplificación de los marcadores ISSR presentando la mejor definición de banda el primer 815 a una concentración de 1.5 mM de MgCl ₂ y el <i>primer</i> 811 a una concentración de 3 mM de MgCl ₂	43
Figura 18:	a) Primer HB12 con una concentración de 3 mM de MgCl ₂ y una temperatura de 37°C; b) Primer 835 con una concentración de 1.5 mM de MgCl ₂ . Amplificación de los primer HB12 y el primer 835; con las 51 muestras de la colección de melina. Carril Kb: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA <i>Ladder</i> de Invitrogen TM ; Carril Tes: muestra testigo; Carril (-): muestra con agua Ultrapura.	45
Figura 19:	Análisis fotográfico de los <i>primers</i> : a) 807 y b) 812 en el software TotalLab 1D versión 14.0 cotejando con el número de pares de bases del marcador 1 Kb plus DNA <i>Ladder Marker</i> INVITROGEN TM , siendo el carril 1 y 28 en las figuras a) y b).	47
Figura 20:	Dendograma UPGMA para los 51 genotipos de melina con el coeficiente de similitud <i>Jaccard</i> , realizado en el programa NTSYS.pc versión 2.02. Representación de los grupos A, B y C que conforman a la colección de melina.	52
Figura 21:	Dendograma UPGMA para los 51 genotipos de melina con el coeficiente de similitud <i>Simple Matching</i> , realizado en el programa NTSYS.pc versión 2.02. Representación	

	de los grupos A, B y C que conforman a la colección de melina.	53
Figura 22:	Provincias pertenecientes a la división política de Costa Rica, azul cantón Matina de la provincia de Limón (rojo) y café para el cantón Buenos Aires de la provincia Puntarenas (verde).	54
Figura 23:	Distancia del cantón Matina de la provincia de Limón hasta el cantón Buenos Aires de la provincia Puntarenas.	54
Figura 24:	Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud de <i>Jaccard</i> , que indica la agrupación de las 51 muestras de melina, encontrándose con una subdivisión A (rojo), B (azul) y C (amarillo).	58
Figura 25:	Análisis de coordenadas principales, en tres planos de los subgrupos A, B y C, con el coeficiente de similitud de <i>Jaccard</i>	59
Figura 26:	Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud de <i>Simple matching</i> , que indica la agrupación de las 51 muestras de melina, encontrándose con una subdivisión A, B y C.	60
Figura 27:	Análisis Molecular de Varianza de los tres subgrupos: A con 16 accesiones, B con 20 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.	61
Figura 28:	Análisis Molecular de Varianza de dos subgrupos: A con 16 accesiones y B con 20 accesiones, de la colección de melina.	62
Figura 29:	Análisis Molecular de Varianza de dos subgrupos: A con 16 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.	63
Figura 30:	Análisis Molecular de Varianza de dos Subgrupos: B con 20 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.	64

RESUMEN

En el Ecuador existen las condiciones climáticas y edafológicas necesarias para el buen desarrollo de la especie *Gmelina arborea*, la cual es exótica muy importante para el desarrollo económico, que fue introducida al país en el año 2008 por la Subsecretaría de Producción Forestal (SPF) perteneciente al Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP) para el programa de Reforestación con Fines Comerciales. En el país no se dispone de información relacionada con la variabilidad genética de melina. En esta investigación se logró caracterizar la diversidad genética de las 51 accesiones de *G. arborea* perteneciente a la Estación Experimental Litoral Sur del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (EELS-INIAP). Utilizando 11 marcadores moleculares, secuencias intermedias de repeticiones simples (ISSR), se determinó un valor promedio de 19.45 alelos/*loci*, el contenido de información polimórfica (PIC) de 0.26, la heterocigosidad esperada (H_e) 0.27 y un polimorfismo de 82.04% para cada *primer*. En el análisis de agrupamiento realizado se determinó un importante rol en el origen geográfico de las muestras ya que la principal discrepancia se basó en su procedencia, del cantón Matina de la Provincia de Limón o del cantón Buenos Aires de la Provincia de Puntarenas en Costa Rica, formando mediante el análisis del dendrograma UPGMA tres subgrupos: A, B y C. Con el análisis de duplicados genotípicos, el subgrupo B presentó la más alta tasa de duplicados en número de alelos. La mayor diversidad genética se encontró dentro de los subgrupos con un 85% y entre los subgrupos con un 15%, considerando líneas parentales comunes, acentuando los fenotipos para la selección de los mejores individuos.

PALABRAS CLAVES:

- **DIVERSIDAD GENÉTICA**
- **GMELINA ARBOREA**
- **ISSRS**
- **MELINA**
- **UPGMA**

ABSTRACT

There are climatic and soil conditions necessary for the good development of the tree species *Gmelina arborea* in Ecuador, which is an important exotic species for economic development and was introduced into the country in 2008 by the Undersecretary of Forest Production (SPF) belonging to the Ministry of Agriculture, Livestock, Aquaculture and Fishery (MAGAP) for the Commercial Reforestation program. Our country does not have information related to the genetic variability of melina. In this research, the genetic diversity of the 51 accessions of *G. arborea* belonging to the Southern Littoral Experimental Station of the National Institute of Agricultural Research (EELS-INIAP) was characterized. Using 11 molecular markers, intermediate sequences of simple repetitions (ISSR), an average value of 19.45 alleles / loci, polymorphic information content (PIC) of 0.26, expected heterozygosity (He) 0.27 and a polymorphism of 82.04% were determined for every primer. In the analysis of grouping, an important role was determined in the geographic origin of the samples since the main discrepancy was based on its origin, from the canton Matina of the Province of Limon or the Buenos Aires canton of the Province of Puntarenas in Costa Rica, forming three subgroups, A, B and C, by means of UPGMA dendrogram analysis. With the analysis of genotypic duplicates, subgroup B showed the highest duplicate rate in allele numbers. The greatest genetic diversity was found within subgroups with 85% and subgroups with 15%, considering common parental lines, emphasizing the phenotypes for the selection of the best individuals.

KEYWORDS:

- GENETIC DIVERSITY
- GMELINA ARBOREA
- ISSRS
- MELINA
- UPGMA

1 CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del problema

La especie forestal Melina, (*Gmelina arborea* Roxb.) pertenece a la familia Verbenaceae, originaria del sureste de Asia, específicamente de la India. Se distribuye en los países tropicales a nivel mundial, en un rango altitudinal entre los 0 a 1,000 msnm, con precipitaciones medias anuales de 1,000 a 4,500 mm tiene un crecimiento rápido con incrementos anuales de 2 m de altura y de 3.6 cm de diámetro, el volumen de rendimiento es 20 a 35 m³/ha/año y un turno o rotación estimado es de 12 años (Vinueza, 2012). Por las características descritas es un árbol maderable cotizado en la industria internacional para la producción de pulpa de papel, además presenta excelentes características para la fabricación de muebles y productos terciarios (paneles y vigas) (Roque, 2004).

La especie maderable *G. arborea* siendo nativa de la India, fue introducida como especie exótica a partir del año 2008 en el Ecuador. Nuestro país ofrece las condiciones edafológicas y climáticas necesarias para su desarrollo, debido a que *G. arborea* posee un índice de crecimiento rápido. Por lo que es acogido por países en desarrollo entre ellos el Ecuador, para suministros futuros de madera procedentes de plantaciones forestales (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, 2000). La producción de *G. arborea* en el Ecuador está priorizada en la región tropical y subtropical de la Costa por la Subsecretaría de Producción Forestal del MAGAP (SPF). Se está trabajando en la introducción de la especie con los agricultores de la zona y en los productores de madera en la provincia de Santo Domingo de los Tsáchilas (Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca, 2015). Desde el año 2014 el Ministerio de Agricultura, Acuacultura y Pesca (MAGAP), a través de la (SPF) implementaron el “Programa de incentivos para la reforestación con fines comerciales”. Potenciando la productividad, competitividad y sostenibilidad del negocio forestal, con varias especies entre ellas *G. arborea*.

Esta especie presenta un gran potencial para la industria, por tanto se hace indispensable aplicar principios básicos de manejo forestal, con el objetivo de aumentar la productividad y la adaptabilidad de esta especie introducida, así como la conservación a largo plazo de su diversidad genética (Mesen, 2001).

El uso de marcadores genéticos de tipo morfológico que ayudan a la selección de árboles de élite reforzando con los marcadores moleculares permiten la caracterización del germoplasma (Wilches, 2004). Mientras que los estudios genéticos, permiten determinar el polimorfismo, identificar individuos de distintas variedades intra-específicas, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones filogenéticas y distinción de individuos con origen clonal y sexual (González & Aguirre, 2007). En *G. arborea* se han realizado estudios de diversidad genética utilizando marcadores moleculares como *Amplified Fragment Length Polymorphism* (AFLP) microsatélites e ISSRs mostrando un alto polimorfismo a nivel de especie y moderado dentro de la población en otros países pero no en el Ecuador (Araya *et al.*, 2005; Naik *et al.*, 2009; Liao *et al.*, 2010). Entre los diferentes tipos de marcadores moleculares disponibles para el estudio de melina una alternativa para iniciar los trabajos con marcadores de variabilidad genética son los ISSR (González & Aguirre, 2007), que son la base de esta investigación.

En Ecuador, se iniciaron trabajos en *G. arborea* sobre descripción taxonómica y botánica para el programa “Ecuador forestal”, en el cual se menciona la producción a nivel de vivero (Vinuesa, 2012). En el país, la Asociación Ecuatoriana de Productores de Teca y Maderas Tropicales (ASOTECA) provee de semillas certificadas de *G. arborea* procedentes de Costa Rica (Asociación Ecuatoriana de Productores de Teca y Maderas Tropicales, 2013); sin embargo, el Ecuador no cuenta con programas de mejoramiento en la especie forestal melina, ni estudios de diversidad genética necesarios para esta especie.

1.2 Justificación

La Subsecretaría de Producción Forestal del MAGAP tiene programas de mejoramiento de especies forestales que necesitan contar con material genético que exprese las cualidades deseadas. De ahí que es indispensable contar con el conocimiento de la diversidad genética de la especie en estudio, priorizada por el MAGAP por su rápido crecimiento para la producción forestal con fines comerciales. En este contexto, el Departamento Nacional de Biotecnología de la EESC-INIAP junto con el programa Nacional de Forestería propone el estudio de la diversidad genética de *G. arborea* con marcadores moleculares ISSR, los cuales caracterizan y estiman la diversidad genética; así como, las relaciones genéticas existentes entre los individuos de la colección. Esta información básica servirá para el programa de mejoramiento asistido de esta especie.

Una de las herramientas más utilizadas para encontrar la “huella digital genética” son los marcadores moleculares. Entre ellos los “*Inter Sequence Repeats*” (ISSR), estos marcadores son amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Los segmentos de ADN amplificados poseen una posición fija en un gen llamados *locus*, con su plural *loci*. Esta tecnología permite obtener información más amplia a nivel molecular del estado de la distribución de los alelos, y su variedad genética. Además identifican cada uno de los *loci* en los segmentos de ADN presentes, mostrando el número de pares de bases de cada segmento amplificado por la PCR, comparando las bandas con un marcador de peso conocido. Adicionalmente detectan el polimorfismo de cada individuo mediante diferentes programas de bioestadística, siendo estos análisis sensibles a la presencia o ausencia del alelo en el *locus* de interés (González & Aguirre, 2007; Rentarúa, 2007).

Los marcadores moleculares como los ISSRs son reproducibles, lo que permite un mayor soporte estadístico de sus resultados. En este caso, los ISSR requieren concentraciones bajas de ADN y en algunos casos un material genético de poca calidad, también estos marcadores poseen una alta sensibilidad, los resultados se obtienen en un menor tiempo y con bajo presupuesto, esto ha hecho que en los últimos años este tipo de marcadores sean utilizados ampliamente como es el caso de esta investigación (González & Aguirre, 2007).

1.3 Objetivos de la Investigación

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar la diversidad genética de la población de *Gmelina arborea* perteneciente a la colección de la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP, mediante marcadores moleculares ISSR.

1.3.2 Objetivos específicos

- Determinar la diversidad genética de la colección de *G. arborea* de la EELS (Estación Experimental Litoral Sur) con marcadores moleculares ISSR.
- Identificar duplicados genotípicos presente en la colección de *G. arborea* en estudio.
- Identificar grupos representativos de la colección de *G. arborea* en estudio.

1.4 Marco referencial

1.4.1 Taxonomía

Reino: Plantae

División: Angiospermae

Clase: Eudicotyledoneae

Subclase: Asteridae

Orden: Lamiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Gmelina*

Especie: *Gmelina arborea* Roxb.

Nombre Común: Melina

Nombres comunes relacionados: Melina, Shivan, Gambar, Gamari.

1.4.2 Descripción Botánica

Es un árbol decíduo, no presenta ensanchamientos en la base del tronco, y puede llegar a los 30 metros de altura y 120 cm de diámetro. Su madera puede tener varias tonalidades de color que van de blanco grisáceo a marrón amarillento. Entre la madera interna (duramen) y la madera en formación (albura) solo hay variación de tonalidades mas no de calidad por eso su uso en la realización de muebles y pallets.

1.4.2.1 Descripción de las flores

Las flores son numerosas de colores amarillo – anaranjadas y marrones, son hermafroditas, de tamaño mediano con un largo de 2.5 cm, se agrupan en racimos y una disposición en panículas terminales (eje central con ramas), cuya inflorescencia es un racimo, corola con 4 – 5 sépalos soldados a la parte inferior del ovario, cáliz 2.5 cm de largo con 4 estambres dispuestos simétricamente (Figura 1). (Ramírez, 1997; Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombia, 2016; Rojas 2004).

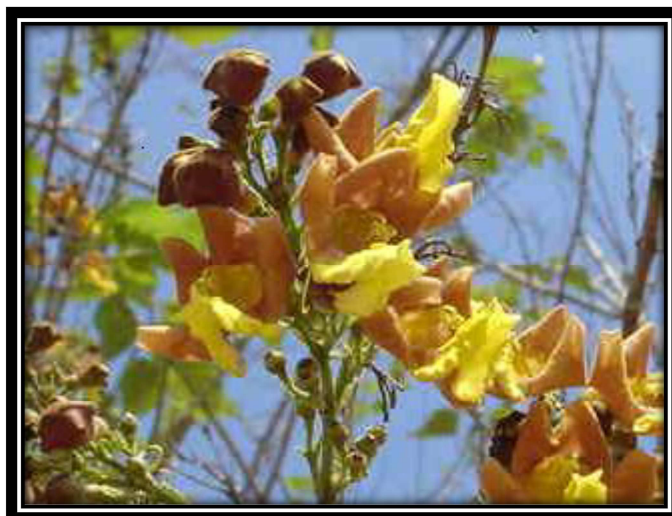


Figura 1: Flores de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.2 Descripción de las hojas

Son de tipo simple, ubicación opuesta, acuminadas, cordiformes glaucas poseen forma acorazonada con medidas de largo 10 a 25 cm y ancho de 5 a 18 cm, color del haz verde glabra, color envés verde claro, borde entero, dehiscencia alta y su pubescencia envés, con frecuencia la especie pierde sus hojas entre los meses de enero o febrero en las regiones que se cultiva, produciendo hojas nuevas en los meses de marzo o abril (Figura 2).(Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombia, 2016; Rojas, 2004).



Figura 2: Hojas de árboles de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.3 Descripción de los frutos

Son del tipo drupa, con un color verde o amarillo con pericardio coriáceo lustroso de forma elipsoide de largo de 2.00 a 2.50 cm y ancho 1.00 a 1.50 cm, son de tamaño pequeño (Figura 3). (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombia, 2016).



Figura 3: Fruto de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.4 Descripción de las semillas

Poseen una forma ovoide membranosa muy delgada, color café, lisa, opaca, con un tamaño mediano largo de 2.00 a 3.5 cm y ancho de 1.00 a 1.50 cm, con una dispersión barocórica, producción de 700 a 1400 semillas por kilogramo, presenta dos cotiledones y el embrión es recto, capacidad germinativa de un 70% a 95% (Figura 4) (Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombia, 2016; Rojas, 2004).



Figura 4: Fruto de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.5 Descripción del tronco

Totalmente rectilíneo (Figura 5).



Figura 5: Tronco melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.6 Descripción de la copa

Presenta la forma de cúpula amplia en sitios abiertos, sin embargo densa y compacta en plantaciones (Figura 6).



Figura 6: Copa de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.2.7 Descripción de la raíz

Presenta tejido protector (súber), con presencia a nivel del suelo, pero su sistema radical es profundo, apareciendo sus raíces en suelos que tienen capas endurecidas u otros limitantes de profundidad (Figura 7) (Vinueza, 2012; León, 2000).

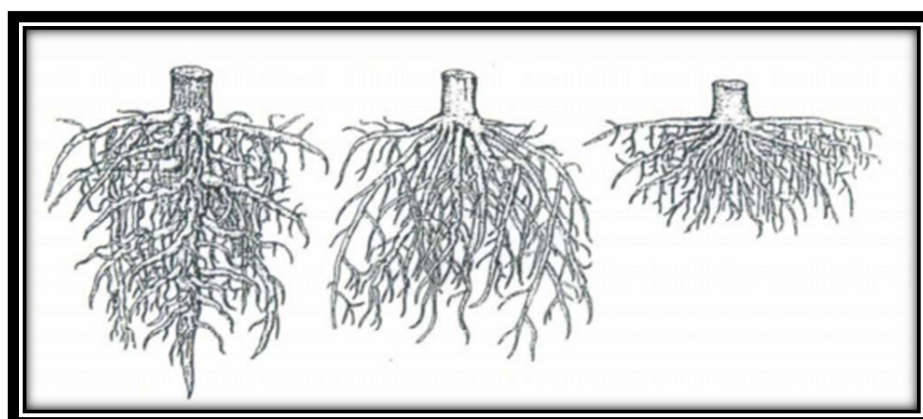


Figura 7: Tipos de raíces que adopta melina.

Fuente: (León, 2000).

1.4.2.8 Descripción de la corteza

Presenta un tono marrón y rugoso (Figura 8).



Figura 8: Corteza de melina.

Fuente: (Rojas, 2004).

1.4.3 Reproducción natural y asistida de melina

G. arborea es una especie diploide con 20 cromosomas en cada gameto ($n = 20 = 2x$) (Chatha, 1988) para la reproducción hay un aporte igual de material genético por parte del polen y óvulos presentes en las flores del mismo árbol o de distintos árboles. Debido a la forma de su flor, la autopolinización natural resulta poco probable. La polinización en *G. arborea*, es principalmente zoófila y limitadamente anemófila. Sus copas sirven de alojamiento a numerosos tipos de insectos voladores que son los vectores principales de la polinización (Bowen, 2016). Para el establecimiento de plantaciones comerciales es necesaria la producción masiva que se puede llevar a cabo por dos vías: 1) Sexual y 2) Asexual. La vía sexual con la reproducción mediante semilla con fuentes semilleras: 1.1) Rodales semilleros naturales o plantados con fenotipos excelentes; 1.2) Huertos semilleros con descendencia de árboles plus a) obtenidos mediante injertos o clones, o b) ensayos en sus progenitores. Así como la reproducción asexual de mayor facilidad para la propagación vegetativa donde no hay condiciones especiales a tener en cuenta (Rojas, 2004).

1.4.4 Distribución de la especie

Es un árbol nativo del sureste de Asia, específicamente de la India, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, sur de China, Laos, Camboya, Sumatra ubicada en Indonesia. Su distribución está en los países tropicales entre las latitudes 5° N -30° N detallada (Figura 9). También se puede encontrar a nivel mundial en zonas con bosques húmedos y muy húmedos de la región tropical. Así como en la zona del bosque húmedo montano bajo de la región subtropical que presente las condiciones necesarias (Vinueza, 2012; Rojas, 2004).

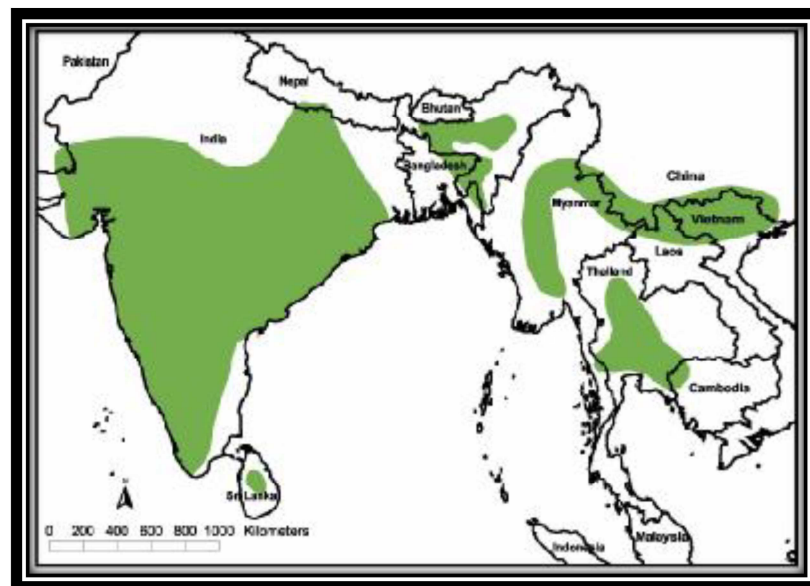


Figura 9: Distribución geográfica natural de melina.

Fuente: (Dvorak, 2004).

1.4.5 Características edafoclimáticas

Requerimientos climáticos

Altitud: de 0 a 1,000 metros sobre el nivel del mar.

Precipitación: de 1,000 a 4,500 mm por cada año.

Temperatura: de 22 a 27 grados centígrados.

1.4.6 Requerimientos edáficos

Para el óptimo desarrollo de melina los suelos deben ser bajos, profundos sin obstáculos para el adecuado desarrollo radical. La humedad debe ser constante con un buen drenado. Igualmente los suelos deben contener Calcio y Magnesio; los mejores sitios son los suelos con alto contenido de limos en los valles aluviales francos o franco arenoso que tengan rangos de pH alcalinos (Rojas, 2004), junto con algunos parámetros adicionales que se observan en la Tabla 1.

Tabla 1:

Requerimientos ambientales para el óptimo crecimiento de melina.

Lineamientos ambientales	Valores
Altitud	De 0 a 900 (msnm)
Temperatura óptima	De 24 a 29 grados centígrados
Precipitación	De 2000 a 2500 (mm)
Exposición	Heliófita (intolerante a la sombra)
Lluvia anual	8 meses de lluvia con 4 meses secos
Tipo de suelo	Suelo franco poco arcillosos
Zonas biótica	Bosque húmedo tropical y muy húmedo tropical: bosque seco tropical
Topografía del suelo	Se desarrolla en suelos planos, ondulados
pH de suelos	Levemente ácido de 5 a 6
Profundidad del suelo	Como mínimo 60 cm, adecuada de 100 cm
Pendientes	Hasta pendientes de 36 grados
Limos fértiles	Prefiere suelos fértiles
Pedregosidad profunda	Se recomienda espacios libres de piedras
Humedad del suelo	Suelos inundados dañan a los árboles
Resistencia eólica	No es resistente a vientos fuertes

Fuente: (Chavarria, 1993).

1.4.7 Incremento medio anual de biomasa

La producción de madera (biomasa) depende principalmente de la calidad del suelo donde se cultiva pudiendo aumentar o disminuir la producción forestal. Para determinar el Incremento Medio Anual (IMA), se debe tener en cuenta el potencial de crecimiento de la especie, que se relaciona directamente con los factores ambientales. Como son el clima, suelo, fisiografía (forma del suelo) y biota; que

definen la fertilidad del sitio. Se realizó un estudio de la calidad del sitio para la región del Pacífico Sur dando un volumen comprendido de 10 a 60 m³/ha/año (Tabla 2) (Zeaser, 1999). Para un acercamiento a la realidad nacional en el Ecuador, en condiciones de vivero, melina muestra un rendimiento promedio en volumen de 20 – 35 m³/ha/año, dependiendo de la capacidad productiva del sitio (Vinueza, 2012).

Tabla 2:

Clasificación de sitios para la región del Pacífico Sur.

Clase de sitio	Incremento medio anual del volumen comercial (m ³ /ha/año)*
1	55 ± 5
2	45 ± 5
3	35 ± 5
4	25 ± 5
5	15 ± 5
6	5 ± 5

*Volumen sin corteza de melina hasta la altura del diámetro de 8 cm, con una edad base de 5 años.

Fuente: (Zeaser, 1999).

Vallejos (1996) propone otra clasificación centrada en el mismo principio, pero desarrollada con mayor detalle definiendo 5 clases de productividad de melina que se basó en el potencial de crecimiento de la especie (Tabla 3).

Tabla 3:

Clasificación de lugares fértiles según el Incremento Medio Anual (IMA).

Clasificación	Diámetro (cm/año)	Altura (m/año)	Área basal (m ² /ha/año)	Volumen (m ³ /ha/año)
Excelente	> 4.63	> 3.91	> 4.64	> 37.78
Buena	3.61 - 4.62	3.21 - 3.90	3.40 - 4.63	24.50 - 37.77
Medio	2.91 - 3.60	2.33 - 3.20	2.21 - 3.39	15.34 - 24.49
Baja	1.91 - 2.90	1.23 - 2.32	1.54 - 2.20	6.79 - 15.33
Marginal	< 1.90	< 1.22	< 1.53	< 6.78

Fuente: (Vallejos, 1996).

1.4.8 Turno o rotación

El turno de rotación, de *G. arborea* se mide en años y es aquel en el que se alcanza la máxima producción de biomasa, por consiguiente, esta especie maderable presenta el menor turno comparándola con otras especies maderables como son: Laurel, Cedro y Guayacán. Si la finalidad del cultivo es la producción de pulpa de papel, combustible, tarimas u otros; los turnos de rotación esperados serán de 5 – 6 años. Si el destino del cultivo es la producción de madera de contrachapado, madera maciza para vigas, estanterías o usos varios serán turnos de rotación de 10 – 12 años, con una selección a los 3 años (Rojas, 2004; Diaz, 1997).

1.4.9 Propiedades de la madera

1.4.9.1 Organolépticas

La madera de melina se describe como de color amarillo pálido para la albura y de gris a gris pálido para la madera del duramen, cuando recién se encuentra talada en verde. Se distingue dos secciones en la madera: albura y duramen; cuando la madera se encuentra totalmente seca no hay distinción de colores entre las dos porciones de la madera. La principal causa de la variación del color es la presencia de madera de reacción la cual también afecta las propiedades físico-mecánicas en el desempeño en procesos industriales. Los anillos de crecimiento se distinguen en las especies desarrolladas en regiones con estaciones secas bien definidas. Su brillo es considerado moderado, olor característico cuando está verde (recién talada), no presenta sabor alguno, textura fina y baja densidad (Rojas, 2004).

1.4.9.2 Físicas y mecánicas

Las propiedades físicas que presenta melina es su peso específico con un valor de 0.5 N/m^3 ya que posee una humedad superior al 150% esto es en condición verde. La contracción tangencial es de 8.01 y la relación de la contracción tangencial y radial es de 2.12 que tiene una clasificación moderadamente estable una vez que este seca, por lo que es muy utilizada para muchos usos. Las propiedades mecánicas de la

madera de *G. arborea* es moderadamente liviana con un contenido de humedad del 12%, tenemos otras propiedades como son: punto de saturación de las fibras, flexión estática, compresión paralela y particular al grano y su dureza que se observa en la Tabla 4 (Vinueza, 2012; Rojas, 2004).

Tabla 4:
Propiedades físicas y mecánicas de *G. arborea*.

Propiedades		Unidades	Promedios	Clasificación
Densidad	al 12% C.H.	g/cm ³	0.58	Mediana
	Anhidra	g/cm ³	0.54	Mediana
Peso específico	Básico		0.50	Moderada pesada
Contracción total	Volumétrica	%	8.01	Muy baja
	T/R	%	2.12	Moderada estable
Saturación de fibras	Volumétrica	%	26.40	Normal
Flexión estática	MOR	kg/cm ²	963.60	Medio
	MOE	kg/cm ²	105,313.20	Bajo
Compresión paralela al grano	MOR	kg/cm ²	460.59	Alta
Compresión perpendicular al grano	ELP	kg/cm ²	70.92	Mediana
Dureza	Axial	Kg	415.161	Blanda
	Perpendicular	Kg	357.60	Muy blanda
	Tangencial	kg/cm ²	125.15	Alta

Fuente: (Vinueza, 2012).

1.4.10 Marcadores ISSR

Fuente: (González & Aguirre, 2007).

1.4.10.1 Ventajas y desventajas de los ISSR

Las ventajas que presentan los marcadores ISSR son: detectar un alto polimorfismo, su reproducibilidad es aceptable ya que utiliza temperaturas de alineación altas en la PCR. Se trabaja con concentraciones bajas de ADN, se construyen los *primers* sin el conocimiento previo de la secuencia del genoma de la especie que se va a estudiar. La visualización puede ser realizar en geles de acrilamida o en agarosa, por último, son sencillos de realizar, eficientes y los valores monetarios no son elevados.

Por otro lado tenemos las desventajas en la utilización de los ISSR que se centran en, la comparación de las bandas de los individuos, y la guía principal es el número de pares de bases de cada *locus*. También, como son marcadores dominantes no se pueden determinar algunos parámetros de heterocigosidad como F_{IS} y F_{IT} . Considerando que podemos estimar la heterocigosidad *a priori* estimando que la población en estudio se encuentre en equilibrio de Hardy-Weinberg.

1.4.11 Genética de poblaciones

La genética de poblaciones, estudia las leyes y principios genéticos que rigen a poblaciones completas de organismos. No se aplican individualmente, estos estudios determinan la variación en las frecuencias genéticas que se relaciona directamente con la genética evolutiva en poblaciones. Una población se la examina por la variación de fenotipos que son los rasgos fisiológicos, morfológicos, por lo tanto, la variación de genotipos se determinan con los marcadores moleculares (De Vicente & Fulton, 2004). Una población compuesta por individuos aislados y progenie común, entre sí, su variabilidad será baja. En esta situación cuando las condiciones ambientales varíen esa población no cuenta con la variabilidad genética necesaria para expresar genes que ayuden al cambio, la población se podría extinguir.

La información genética que transfieren los progenitores hacia su descendencia no cambia en toda su vida no varía, independientemente de su entorno en el cual se desarrolla. El cambio evolutivo o alteración de su genotipo se produce en especies cuando se genera la variación genética. Siendo el polimorfismo, la existencia de varias formas de un gen o carácter, dado que, en términos genéticos se refiere a la concomitancia de dos o más genes alternos que muestra población o se encuentra entre poblaciones alejadas geográficamente pero de la misma especie. Molecularmente el polimorfismo es la sincronía de bandas alternas que se muestran con la PCR y la electroforesis (De Vicente & Fulton, 2004).

El aumento o disminución del polimorfismo se da por algunas causas, a consecuencia, de la discontinuidad de los hábitats, la reubicación de las poblaciones, la migración no es uniforme, la reproducción no es al azar en la población. La estructura de una población se da por la existencia de la deriva genética definida según Cornelius (1994), como un cambio en las frecuencias alélicas, debido al azar. Otros conceptos que ayudan a la evaluación de la diversidad genética: el principio de Hardy-Weinberg, la frecuencia alélica.

1.4.11.1 Diversidad genética de Nei (1973)

Es el cálculo en la media de los valores para cada locus en dicha colección; cuantifica la igualdad de las frecuencias alélicas en los *loci*. Expresando la heterocigosidad esperada en el locus con un apareamiento al azar, además este índice puede estimar la diversidad genética: Diversidad genética total, Diversidad genética intrapoblacional y la Diversidad genética interpoblacional (González, 2016).

1.4.11.2 Polimorfismo

Las variaciones en el ADN son mutaciones, se originan por alteraciones en los mecanismos de reparación y replicación, influenciando también los factores ambientales. Las mutaciones pueden tener efectos que causen un mal progresivo pero que no produzca su fallecimiento y causen solo enfermedades, conocido como

polimorfismo, dando una variación alélica entre los especímenes en estudio, aumentando su diversidad, los alelos son polimórfico cuando su frecuencia calculada es mayor al 1%. El polimorfismo se produce por (cambio en el número de secuencias repetidas, deleciones e inserciones). El estudio del polimorfismo tiene varias aplicaciones como son: determinar su evolución en la historia, tratar de explicar el origen de la especie, otro campo de estudio que se beneficia es el estudio de las enfermedades multigénicas y la medicina forense (Checa, 2007).

1.4.11.3 Ley de Hardy – Weinberg

Wilhelm Weinberg y Harold Hardy en (1908), demuestran que una población exponencialmente grande, con apareamiento al azar, sin selección natural, migración y mutación, las frecuencias alélicas y genotípicas son constantes al paso de las generaciones, la distribución de la frecuencia se desarrolló a través del binomio de Newton. El binomio $(p+q)^2 = p^2+2pq+q^2$, p^2 es la frecuencia genotípica de los homocigotos, $2pq$ la frecuencia de los heterocigotos y q^2 la frecuencia de los homocigotos recesivos, estas frecuencias se llaman también proporciones de Hardy – Weinberg (HW) y la suma de todas estas proporciones tiene un valor de 1 (Montes de Oca, 2014).

1.4.11.4 Frecuencia alélica para marcadores ISSR

Cuando se analiza un marcador dominante se obtiene un genotipo (GG, Gg, gg) siendo una homocigota y otra heterocigota que se confunden los genotipos (GG y Gg) homocigotos con heterocigotos. Al realizar el proceso de la electroforesis sería: la presencia en el gel de la banda se lo marca con el valor de “1”, el nombre del *locus* es el peso de la banda. Otro genotipo sería (gg) homocigota recesiva que se explica cómo ausencia con el valor “0”.

Las frecuencias se obtienen con el cálculo de los *loci* efectivos, que no se encuentren en toda la colección a analizarse, no se toman en cuenta las bandas que no presenten segregación (monomórfica), es decir que se encuentran presentes las

bandas en todas las muestras y, no ingresan a la matriz de datos binarios, como se muestra en la figura 11, se encontraron cinco locus, se eliminan dos; y se realiza el genotipaje con tres bandas solamente. La presencia de locus se analiza según la ley de Hardy–Weinberg con la presencia ($p^2 + 2pq$), la ausencia homocigota recesiva como (q^2) la suma de ambas frecuencias es igual a uno (De Vicente, 2004).

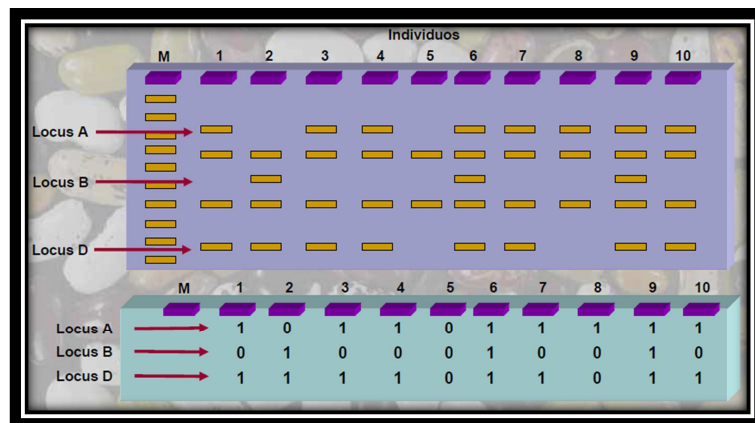


Figura 11: Evaluación de las bandas presentes en un gel para el cálculo de las frecuencias alélicas.

Fuente: (De Vicente, 2004).

La genética de una colección de muestras se determina sumando sus frecuencias alélicas de todos los genes en esa colección que sirve de estudio, la evolución se presenta por el cambio en las frecuencias está es la capacidad que todo individuo posee para su sobrevivencia colaborando en su reproducción. Si hay adaptación, los genotipos de los individuos cambian en las generaciones posteriores y no se relacionaran con las frecuencias de las primeras generaciones en dicha población, lo que implica la existencia de la evolución.

El cálculo estadístico de la frecuencia para un marcador dominante considerado haploide se determina con las frecuencias de la suma total de los locus ausentes “q”, por que presenta una homocigosis recesiva, luego restaremos de uno para determinar “q” que para marcadores ISSR es (p^2+2pq) (De Vicente, 2004).

1.4.12 Estadísticos F

Los estadísticos F o índices de fijación fueron desarrollados por Sewall Wright y otros colaboradores en 1991, el cual plantea medir las desviaciones de frecuencias genotípicas en poblaciones subdividas en tres índices: F_{IT} , F_{IS} , F_{ST} . F_{IT} : Valor que expresa la fijación de las muestras comparándolo con toda la colección. F_{IS} : Valor que expresa la fijación de las muestras con relación a los subgrupos formados. Estos dos valores tanto el F_{IT} como el F_{IS} miden la desviación de las frecuencias genotípicas observadas con las esperadas aplicando en los cálculos el equilibrio de H-W. F_{ST} : Valor de la diferenciación genética entre los subgrupos formados, también considerada como la correlación entre dos alelos tomados de cada subgrupo de forma aleatoria (Estévez, 2009).

1.5 Hipótesis

Existe diversidad genética en la colección de *Gmelina arborea* perteneciente a la Estación Experimental Litoral Sur del INIAP.

2 **CAPÍTULO II**

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.1 La institución

La presente investigación fue realizada en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) en el Departamento Nacional de Biotecnología (DNB) bajo la tutoría de la Blga. Katerine Orbe, responsable del departamento y con la participación del Programa de Forestería - Estación Experimental Litoral Sur – INIAP con la colaboración del Ing. Ricardo Limongi. El estudio fue financiado a través del proyecto: “Fortalecimiento, Investigación, Transferencia de Tecnología, Producción y Servicios - 001-005 biotecnología” del INIAP.

2.1.2 Responsable del proyecto

Danny Jefferson Tafur Salazar

2.1.3 Colaboradores

Directora de Tesis Universidad de las Fuerzas Armadas - ESPE

Dra. Claudia Segovia

Colaboradores de la Estación Experimental Santa Catalina:

Blga. Katerine Orbe Estación Experimental Santa Catalina - INIAP

Ing. Johana Buitrón Estación Experimental Santa Catalina - INIAP

Ing. Leidy Sarmiento Estación Experimental Litoral Sur - INIAP

2.2 Fase I: Procedencia del material vegetal

Se analizaron 51 accesiones de *G. arborea* de la colección de la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) (ver anexo 1), que presenta las siguientes condiciones climáticas: temperatura promedio de 26.5°C, una humedad relativa promedio de 83 % y con precipitaciones anuales de 1,398 mm (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, 2015). La EELS, se encuentra ubicada en el Km 26 Vía Durán-Tambo, al Oeste de Guayaquil, Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas.

2.2.1 Procedencia del material vegetal mediante coordenadas UTM (Universal Transversal de Mercator)

Los datos de la colección del material vegetal, proporcionados por la EELS-INIAP como se muestra en el anexo 1, los cuales constan de las coordenadas UTM. Se transformó a coordenadas geográficas con el software libre “Calculadora.es UTM <> Geo” (Nuñez, 2012). Las coordenadas geográficas de la colección de melina, se ingresaron al software DIVA-GIS versión 7.5 (Hijman *et al.*, 2004). Teniendo en cuenta que la EELS-INIAP se encuentra en el hemisferio Sur, los datos ingresados de Latitud y Longitud son negativos.

2.3 Fase II: Caracterización molecular

2.3.1 Características del laboratorio

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de biología molecular del Departamento Nacional de Biotecnología en la Estación Experimental Santa Catalina (EESC) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias.

2.3.2 Ubicación geográfica

El proyecto se realizó en el Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, los datos georeferenciales y meteorológicos (Tabla 5) y (Tabla 6).

Tabla 5:

Datos georeferenciales de la ubicación de los laboratorios del Departamento Nacional de Biotecnología.

Provincia	Pichincha
Cantón	Mejía
Parroquia	Cutuglagua
Sitio	EESC-INIAP
Altitud	3050 m.s.n.m.
Latitud	0°22'0''
Longitud	79°32'0''

Fuente: Estación Meteorológica Izobamba, ubicada en la EESC-INIAP, 2015

Tabla 6:

Características Meteorológicas de la Estación Experimental Santa Catalina del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias.

	Valores anuales
Temperatura del aire a la sombra °C	12.00
Humedad relativa (%)	79.00
Punto de Rocío	8.10
Tensión de vapor	10.90
Precipitación (mm)	1400.60
Evaporación	1378.50

Fuente: Estación Meteorológica Izobamba, ubicada en la EESC-INIAP, 2015

2.3.3 Recolección de muestras

El material vegetal de la colección corresponde a individuos de una especie introducida, que tienen algunos años de adaptación y una muestra adicional el testigo que se encontraba fuera de los bloques de muestreo. Se colectaron las muestras con criterios de selección fenotípica:

- a) Altura comercial del árbol y presencia de fuerte dominancia apical.
- b) Posición sociológica: dominante o al menos codominante.
- c) Diámetro del tronco a 1.30 m (DAP).
- d) Ausencia de ramas gruesas.
- e) Ausencia de bifurcación.
- f) Ausencia de aletones o gambas basales.

Las muestras recolectadas fueron en número de 51 individuos en la EELS, seccionados en tres bloques; entre ellos el testigo que se encuentra a una distancia de 1 km; colectando sus hojas jóvenes en bolsas con silica gel, para los análisis posteriores.

2.3.4 Procesamiento de muestras

Las muestras de sus hojas jóvenes fueron secadas totalmente con silica gel, posteriormente se tomó una sección más o menos de 9 cm² de la hoja, se colocó en tubos eppendorf, etiquetados con el código del árbol, los mismos que fueron colocados en el macerador para su posterior extracción de su material genético.

2.3.5 Extracción de ADN

Se empleó el protocolo descrito por Souza *et al.*, (2012) siguiendo el siguiente proceso:

- Se añadió a los 100 mg de muestra el Buffer Sorbitol (Tris-HCl, pH 8, sorbitol 0.35M, EDTA 5mM, pH 8, almacenado a 4°C y antes de su uso se añadió PVP-40 1% y 2-mercaptoetanol 1%).
- Se centrifugó durante 10 min a 5700 rpm, se eliminó el sobrenadante, se disolvió el precipitado en 1 ml de Buffer Sorbitol y se repitió el proceso 3 o 4 veces.
- Se añadió 1 ml de Buffer CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8, NaCl 3 M, CTAB 3%, EDTA 20 mM, pH 8, se precalentó a 60°C se añadió PVP-40 1% y 2-mercaptoetanol 0.20 %, y antes de su uso se adicionó Sarkosyl 30%) y se incubó durante una hora a 60°C.
- Se adicionó 700 µl de CIA (Cloroformo: Alcohol Isoamilico 24:1 V/V) se mezcló suavemente durante 20 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm.
- Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió Acetato de sodio (3M, pH 5.20) 1/10 en volumen más Isopropanol 2/3 en volumen, se incubó a -20°C por 12 horas.
- Se centrifugó durante 30 minutos, se lavó 2 veces la primera con 500 µl de etanol al 70% y la segunda con 500 µl de etanol al 100%.
- Se secó el ADN y se disolvió el precipitado en 20-100 µl de solución TE-ARNasa, se incubó por 2 horas a 37°C.

2.3.6 Cuantificación de ADN

2.3.6.1 Gel de agarosa

La extracción realizada se cuantificó cualitativamente con un gel de agarosa al 1% mediante electroforesis por 35 minutos a 100 voltios. Se procedió a sumergir el gel en SYBR® Gold por un tiempo de 30 minutos, y se visualizó en el fotodocumentador.

2.3.6.2 Cuantificación de ADN en el espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTeck.

Para la determinación de la concentración del ADN se colocó 2 ul del resultado de cada una de las 51 muestras en los 6 pocillos del espectrofotómetro para microplacas Epoch™ de BioTeck calibrándolo en un rango de absorbancia 260/280 para determinar la pureza y calidad del ADN.

2.3.7 Validación de ADN

Se amplificó todas las muestras de la colección de melina, se diluyó el ADN en una concentración de 5 ng/μl cada una de las muestras. Adicionando el coctel de PCR descrito por Rigotti *et al.*, (2002) (Tabla 7), con su respectivo programa de amplificación según Rigotti *et al.*, (2002) con modificaciones, (Tabla 8). El primer 824; se utilizó para determinar la presencia y calidad del ADN.

Tabla 7:

Coctel de amplificación para la validación empleando un marcador ISSR.

REACTIVOS	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP	-	-	2.80
BUFFER PCR (X)	10.00	1.00	1.00
MgCl ₂ (mM)	50.00	3.00	0.60
dNTP's (mM)	5.00	0.10	0.20
Primers (uM)	10.00	0.20	0.20
Taq polimerasa (U/uL)	5.00	0.10	0.20
MUESTRA (ni/uL)	5.00	2.50	5.00
Volumen de reacción (uL)			10.00

*CI: Concentración inicial de los reactivos *CF: Concentración final de los reactivos

Fuente: Rigotti *et al.*, 2002 con modificaciones

Tabla 8:**Programa de amplificación, marcadores ISSR.**

PROGRAMA	PROCESO	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	92	4 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	92	30 seg	40 ciclos
3	Apareamiento	37	1 min	
4	Extensión	72	1min	
5	Extensión final	72	10 min	1 ciclo
6	Conservación	4	10 min	1 ciclo

Fuente: Rigotti *et al.*, 2002 con modificaciones

2.3.8 Amplificación de la colección de *G. arborea* con marcadores ISSR

Para la identificación de la diversidad genética de la colección de melina, se procedió a la amplificación con cada uno de los marcadores moleculares ISSR (Tabla 9), previamente evaluados y seleccionados.

Tabla 9:

Primers ISSRs seleccionados para el estudio con *G. arborea* y condiciones óptimas, Y= C ó T, R= A ó G.

PRIMERS ISSR		
N.-	Nombre	Secuencia
1.	807	AGA GAG AGA GAG AGA GT
2.	808	AGA GAG AGA GAG AGA GC
3.	811	GAG AGA GAG AGA GAG AC
4.	812	GAG AGA GAG AGA GAG AA
5.	814	CTC TCT CTC TCT CTC TA
6.	815	CTC TCT CTC TCT CTC TG
7.	822	TCT CTC TCT CTC TCT CA
8.	824	TCT CTC TCT CTC TCT CG
9.	835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
10.	836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA
11.	842	GAG AGA GAG AGA GAG AYG
12.	844	CTC TCT CTC TCT CTC TRC
13.	848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG
14.	849	GTG TGT GTG TGT GTG TYA
15.	860	TGT GTG TGT GTG TGT GRA
16.	873	GAC AGA CAG ACA GAC A

Fuente: Naik *et al.*, 2009

Se amplificaron las muestras de ADN en estudio con marcadores ISSR, se realizó el coctel de amplificación (Tabla 10) con el programa térmico descrito en la tabla 11 (Rigotti *et al.*, 2002, con modificaciones). Se realizó la reacción de amplificación en cabina de bioseguridad para evitar contaminación.

Tabla 10:**Coctel de amplificación para marcadores ISSRs.**

REACTIVOS	CI	CF	VOL. 1 rx (uL)
AGUA UP	-	-	2.60
BUFFER PCR (X)	10.00	1.00	1.00
MgCl ₂ (mM)	50.00	3.00	0.60
dNTP's (mM)	2.50	0.10	0.40
Primers (uM)	10.00	0.20	0.20
Taq polimerasa(U/uL)	5.00	0.10	0.20
MUESTRA (ng/uL)	5.00	2.50	5.00
Volumen de reacción (uL)			10.00

*CI: Concentración inicial de los reactivos; *CF: Concentración final de los reactivos

Fuente: Rigotti *et al.*, 2002 con modificaciones

Tabla 11:**Programa de amplificación, marcadores ISSR.**

PROGRAMA	PROCESO	Temperatura	Tiempo	Ciclos
1	Desnaturalización inicial	92	4 min	1 ciclo
2	Desnaturalización	92	30 seg	40 ciclos
3	Apareamiento	37	1 min	
4	Extensión	72	1min	
5	Extensión final	72	10 min	1 ciclo
6	Conservación	4	10 min	1 ciclo

Fuente: Rigotti *et al.*, 2002 con modificaciones

2.3.9 Electroforesis y visualización

Las muestras resultantes del proceso de PCR se analizaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 2%. Para obtener el gel, diluimos 1.6 gramos de agarosa en 80 ml de buffer TAE 1X, se empleó el microondas a potencia normal por 30 segundos, y tres veces por 10 segundos, hasta disolver completamente el agar. Se obtuvo una solución traslúcida cristalina. Se preparó la cubeta del gel para 56 pocillos con los dos peines de 28 pocillos cada uno, se vertió el agar en la cubeta a una temperatura de 37° C se dejó enfriar. Posteriormente se colocó el gel en la cámara de electroforesis horizontal cubriéndolo con el Buffer TAE 1X.

Se cargó cada pocillo con 4.5 µl de ADN producto de la PCR, 2 µl de buffer *blue juice* 5X y pocillos con el marcador de peso molecular 1Kb Plus DNA *Ladder* INVITROGEN®. La corrida electroforética se fijó en 100 Voltios por el tiempo aproximado de 45 minutos. Consecutivamente se preparó una solución 1X de SYBR® Gold diluyendo 25 µl de SYBR® Gold 1000X en 250 ml de buffer TAE 1X, donde se colocaron los geles por un tiempo de 45 minutos aproximadamente en agitación continua. Finalmente se visualizaron los geles producto de la electroforesis en un fotodocumentador ENDURO™ GDS con luz UV, puesto que activa el agente intercalante de fluorescencia SYBR® Gold. Se realizó las fotografías con la ayuda del software que está incluido en el fotodocumentador.

2.3.10 Genotipaje de las muestras de melina en el programa TotalLab 1D

Se realizó el genotipaje, con el análisis de las fotografías obtenidas en el fotodocumentador ENDURO™ GDS mediante el software TotalLab 1D versión 14.0. Este programa sirve como apoyo a la investigación dando un análisis detallado de las imágenes en el gel, con cada uno de los *primers*. Se analizó las pares de bases de cada muestra comparando con el número de pares de bases del marcador 1Kb Plus DNA *Ladder* INVITROGEN® para determinar el número de pares de bases en cada muestra. Se cuantificó los distintos locus con la presencia, asignando el valor igual a “1” o ausencia con el valor igual a “0”, para posteriormente armar una matriz binaria con el número de muestras versus locus con cada uno de los 11 *primers*. La matriz

obtenida se modificó en su formato original, puesto que, cada programa de análisis genético se debe ingresar una matriz diferente definida por su manual de usuario.

Se descargó las fotografías con extensión *.TIF procedentes del fotodocumentador ENDURO™ GDS, en el software TotalLab 1D versión 14.0, se cuantificó las bandas según su número de pares de bases de cada una de las muestras dependiendo el nivel de saturación en píxeles de las fotografías determinando el número de pares de bases según el marcador 1Kb Plus DNA Ladder INVITROGEN® (ver anexo 8), dando como resultado las pares de bases y la posición según la posición de bandas respecto al marcador (Figura 12) y (Tabla 12) respectivamente.

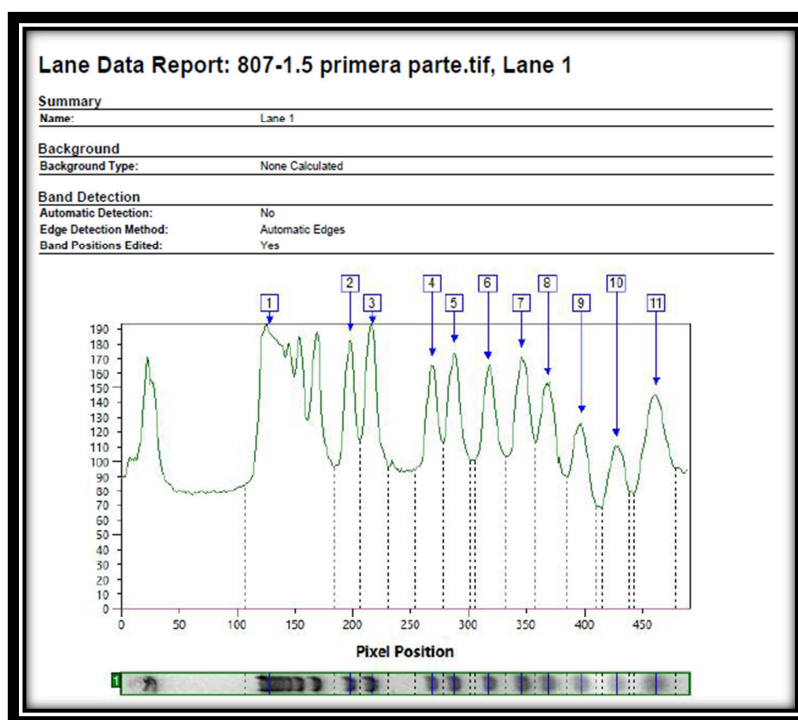


Figura 12: Cuantificación de bandas de melina, mediante el software TotalLab 1D versión 14.0.

Tabla 12:

Tabla de bandas como resultado del análisis del software TotalLab 1D versión 14.0.

Número de bandas	Posición	Pares de bases
1	128	12000
2	198	2000
3	217	1650
4	269	1000
5	288	850
6	317	600
7	346	500
8	369	400
9	397	300
10	427	200
11	461	100

Fuente: Programa TotalLab 1D versión 14.0.

2.4 Análisis de datos

2.4.1 Diversidad genética

Para la determinación de la diversidad genética en la colección de 51 muestras, se empleó el software GenALEX versión 6.5 (Peakall & Smouse, 2012), que determinó la frecuencia de los alelos, el porcentaje de *loci* polimórfico y el Contenido de Información Polimórfica (PIC). Se realizó la matriz binaria en el programa Microsoft Excel, muestras versus alelos en cada *locus*. Se elaboró la matriz con “1” que significa la presencia de un alelo, con “0” la ausencia y con el valor de “- 1” para referirnos a datos perdidos.

2.4.2 Análisis de agrupamiento

El análisis de agrupamiento para la colección de melina, se utilizó el método basado en algoritmos de conglomerados jerárquicos UPGMA (*unweighted pair-group method with arithmetic averages*) (Peña *et al.*, 2010). En el análisis se usaron dos coeficiente de similaridad por cada población: *Jaccard* y *Simple Matching*. Dentro de los parámetros técnicos del programa se utilizó las opciones de marcadores dominantes, haploides y se dispuso a la colección en equilibrio de Hardy – Weinberg (González y Aguirre, 2007).

Los análisis se realizaron en el programa NTSYSpC versión 2.02 para la elaboración de la matriz con el valor de “1” para presencia de banda, ausencia “0” y datos perdidos con el valor de “9”. Se corrió el programa y se formó el gráfico de los conglomerados jerárquicos

2.4.3 Análisis de coordenadas principales

El análisis de coordenadas (ACoP) nos ayuda a conocer la distribución que tiene los individuos en las subpoblaciones, mostrando un plano de visualización dando los vectores que son las coordenadas cartesianas compatibles con la matriz de distancias correspondientes a la ubicación de cada muestra analizada (Cuadras, 2014). Se utilizó el coeficiente de similaridad de *Jaccard* (1908), ya que relaciona el número de especies compartidas con el número total de especies exclusivas (Villareal *et al.*, 2004).

Se determinó el análisis de coordenadas principales (ACoP), mediante el programa NTSYSpC versión 2.02 con el módulo Eigen (Rohlf, 2002), obteniendo los gráficos respectivos.

2.4.4 Análisis molecular de varianza

El análisis molecular de varianza AMOVA es una referencia para determinar la estructura genética a partir de la información contenida en la frecuencia alélica, la

cual es introducida en una matriz de distancias cuadradas euclidianas y a partir de ella se obtiene los componentes de covarianza asociado con posibles niveles de estructura genética (Casalla, 2003).

Para realizar el análisis molecular de varianza se utilizó el software GenALEX versión 6.5 (Peakall y Smouse, 2012), los datos fueron manejados de manera dominante haploide evaluando la divergencia entre las muestras para definir subpoblaciones dentro de la población.

2.4.5 Distancia genética de Nei

Con la ayuda de los análisis de agrupamiento UPGMA y ACoP se determinó los valores de los índices de distancias genéticas, describiendo la formación de subpoblaciones, obteniéndose diferencias genéticas en función de las frecuencias genéticas (Nei, 1979).

Para evaluar la distancia genética de Nei, se ingresó la matriz binaria en el software POPGENE versión 1.32 (Yeh, 1997), seleccionando del menú principal los parámetros definidos para datos de marcadores dominantes.

3 CAPÍTULO III

RESULTADOS

En este capítulo se presentan los resultados del estudio de diversidad genética de Melina a través de la caracterización molecular de las accesiones colectadas (hojas jóvenes) en la Estación Experimental Litoral Sur – INIAP.

3.1 Procedencia del material vegetal

Las muestras fueron colectadas en la Estación Experimental Litoral Sur (EELS-INIAP), Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas. La figura 13, muestra los sitios de colección con su posicionamiento geográfico (ver anexo 1). A través de este proceso de mapeo se identificó que las muestras se colectaron en 3 bloques como se observa en la figura 14 con altitudes comprendidas entre los 32 y 48 m.s.n.m.

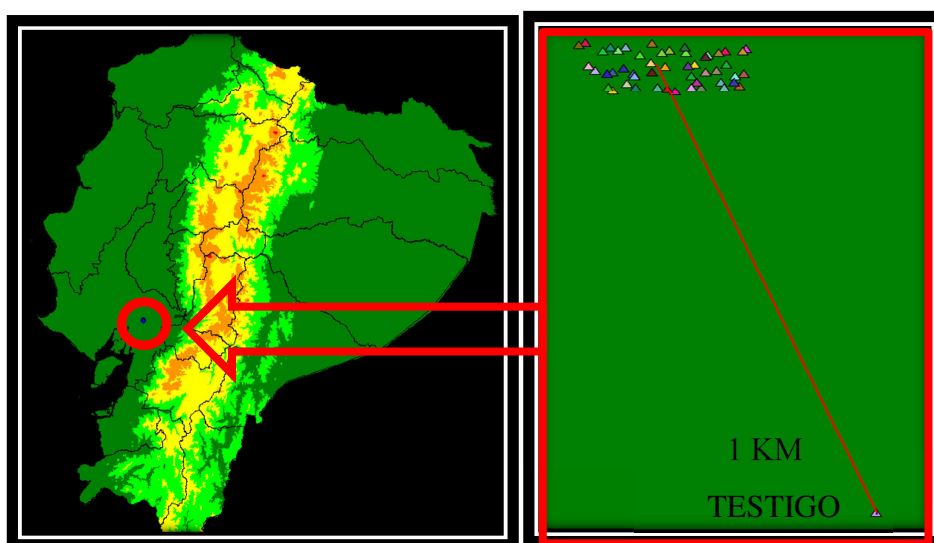


Figura 13: Ubicación mediante de las muestras de melina de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS-INIAP) cantón Yaguachi, provincia del Guayas utilizadas en este estudio. Mapa generado, con el software DIVA-GIS versión 7.5.

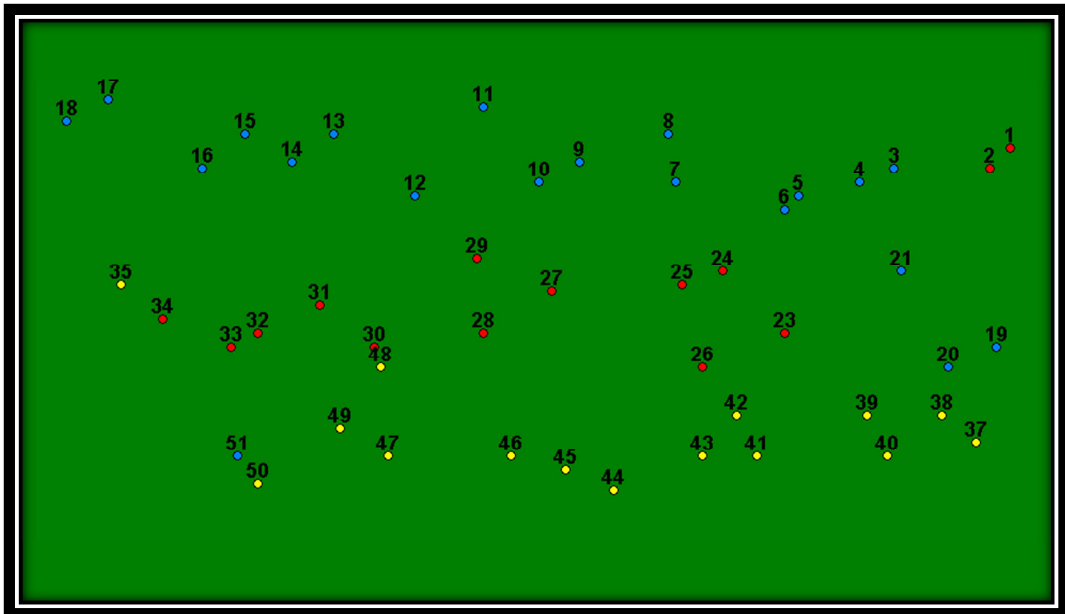


Figura 14: Ubicación de las muestras de melina de la Estación Experimental Litoral Sur, análisis realizado con el software DIVA-GIS versión 7.5. Se muestra tres Subgrupos: A de color rojo, B de color azul y C de color amarillo; la muestra testigo pertenece al subgrupo A, con una distancia de 1Km.

3.2 Caracterización molecular

3.2.1 Muestras analizadas

Se analizó la colección de la EELS – INIAP constituida por 51 muestras como se presenta en el anexo 1.

3.2.2 Extracción y cuantificación de ADN

Se realizaron las extracciones de material genético de los 51 individuos a partir de hojas jóvenes secas provenientes de la colección de la Estación Experimental Litoral Sur – INIAP, siguiendo el protocolo de Souza *et al.*, (2012). Se obtuvo un ADN que no presentó degradación, con una concentración de ADN promedio de 308.91 ng/ μ l, con valores máximos de 832.32 ng/ μ l y mínimos de 60.41 ng/ μ l. El índice de pureza promedio de las muestras extraídas fue de 1.65 con valores comprendidos entre 0.91 y 2.25 (ver anexo 2).

3.2.3 Validación de ADN con el primer 824

Para determinar si la concentración y la degradación del ADN se utilizó como primera vía la corrida de las muestras en un gel de electroforesis. Posteriormente se amplificaron las 51 muestras de melina utilizando PCR con el marcador 824 y así comprobar que el ADN era adecuado para el proceso de amplificación (Naik *et al.*, 2009). La amplificación se realizó produciendo bandas con una buena intensidad como lo demuestra la figura 15. En algunos casos se necesitó amplificar algunas veces, ya que no todas las muestras amplificaron en el primer intento (1-5-13-15-17-19).

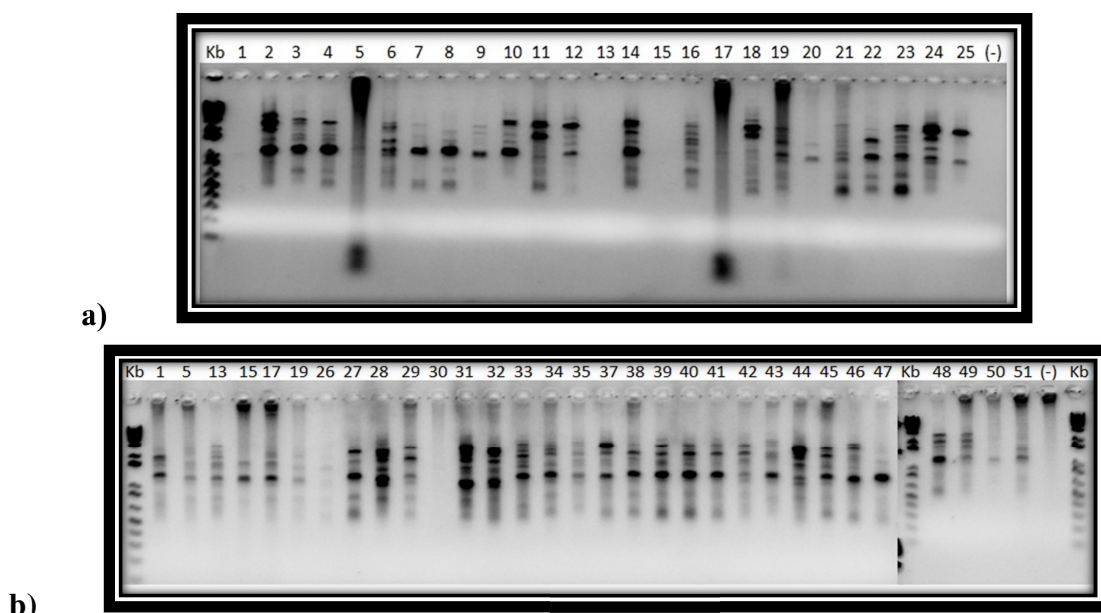
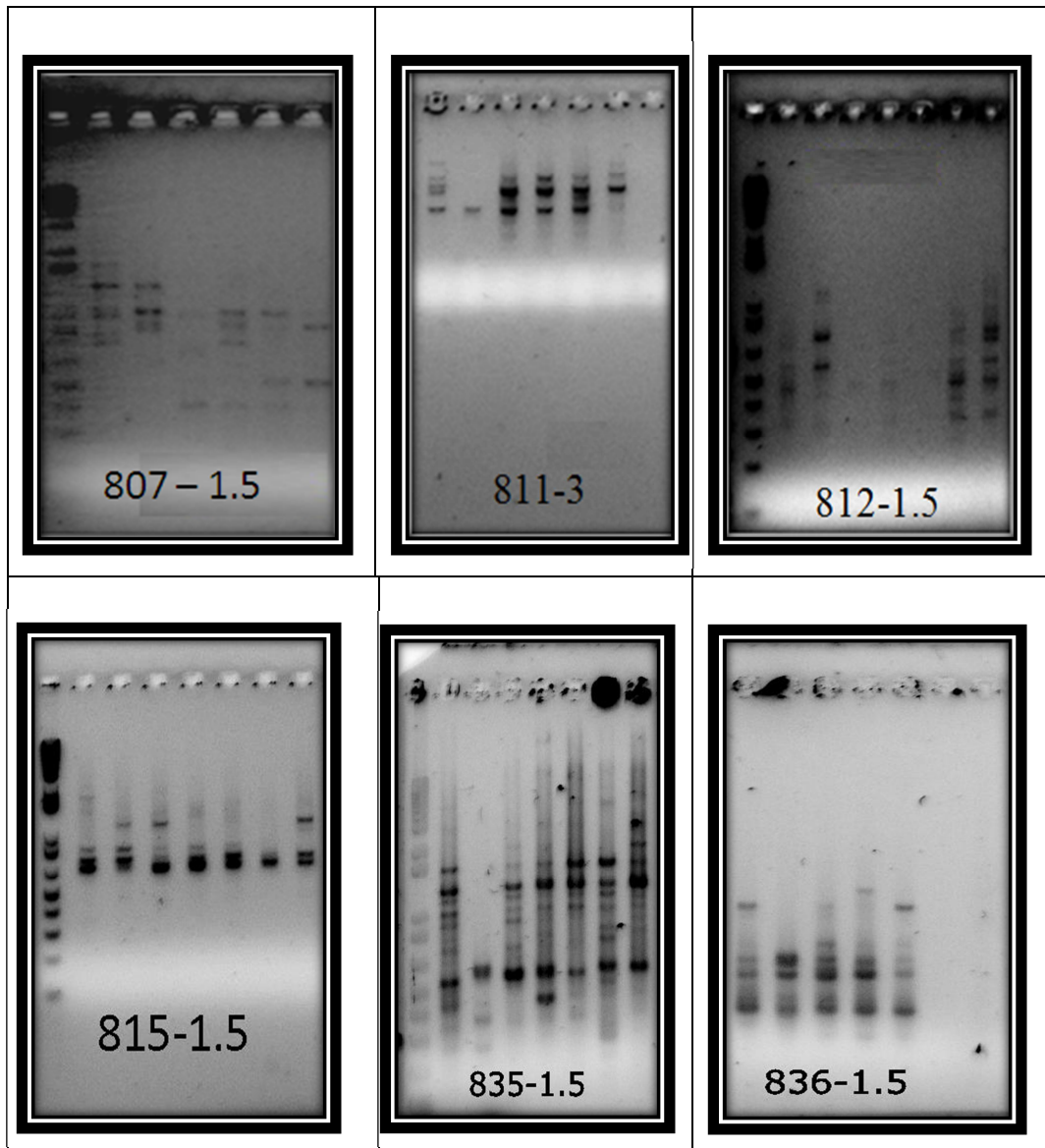



Figura 15: Validación del material genético de melina con el marcador 824 (Carril Kb: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA *Ladder* de InvitrogenTM). a) Gel agarosa al 2% muestras no amplificadas (1-5-13-15-17-19) (ver anexo 3). b) Gel de agarosa al 2% con la validación completa de las muestras de melina.

3.2.4 Pre-selección de ADN con *primers* ISSR

Posteriormente, se realizaron amplificaciones con 22 *primers*: 21 *primers* reportados por Naik *et al.*, (2009) y un *primer* adicional reportado por (Rueda, 2015): de los cuales se seleccionaron 11 debido a que mostraron mayor número de

fragmentos de ADN (Figura 16), una buena resolución de bandas óptimas y al menos un polimorfismo en cada una de las muestras representativas (Tabla 13).



Continúa 

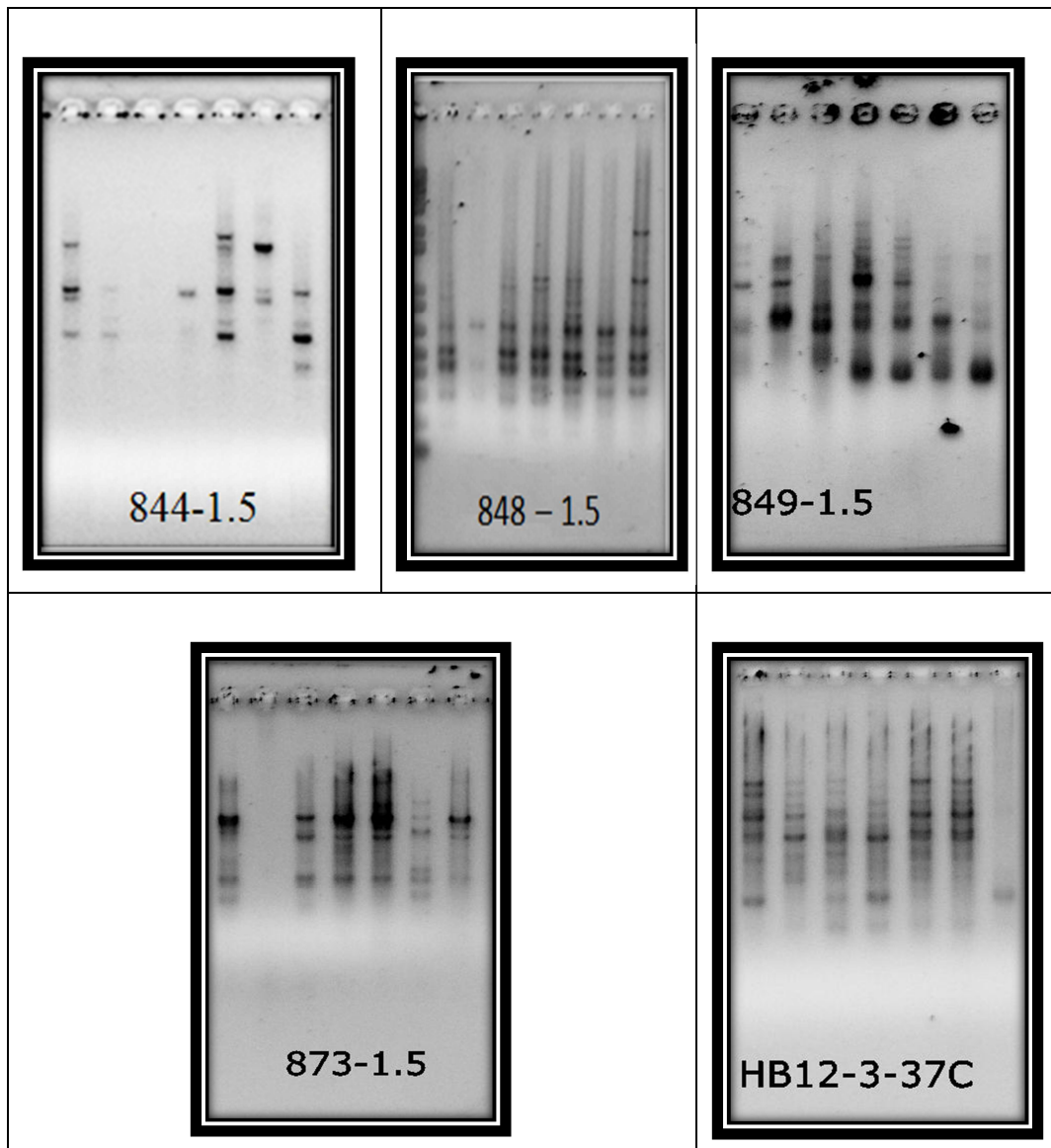


Figura 16: Amplificación de ADN de melina con 11 marcadores ISSR: 807, 811, 812, 815, 835, 836, 844, 848, 849, 873, HB12, luego del nombre del marcador - la concentración, además en el marcador ISSR HB12 se adicionó la temperatura de *annealing*.

Tabla 13:**Primers pre-seleccionados para amplificar toda la colección.**

ISSR	Número de fragmentos polimórficos
807	19
811	18
812	15
815	9
835	20
836	13
844	16
848	14
849	14
873	16
HB12	21

3.3 Optimización de la Técnica de PCR

En base a los resultados obtenidos con los diferentes *primers*, se identificaron los *loci* en cada una de las muestras mediante las fotografías del fotodocumentador (Anexo 4). A partir de este paso se determinó las concentraciones específicas del Cloruro de Magnesio en el coctel de la PCR para cada *primer*, y la temperatura de *annealing* del programa que se utilizó en el termociclador.

3.3.1 Concentración de MgCl₂

Se utilizó el protocolo de Rigotti *et al.*, (2002) con modificaciones como base para el coctel de PCR, se alteró la concentración de MgCl₂ entre 1.5 mM y 3 mM (Tabla 14). Se obtuvo una mejor definición de bandas con la concentración de MgCl₂ de 1.5 mM en los siguientes marcadores ISSR: 807, 812, 815, 835, 836, 844, 848, 849 y 873. Por otro lado, los restantes marcadores ISSR 811 y el HB12 trabajaron mejor con la concentración de 3 mM. Se muestra algunos ejemplos de las amplificaciones con las diferentes concentraciones en la figura 17. Se seleccionaron los 11 marcadores ISSR cada uno con su respectiva concentración de MgCl₂ (Tabla 15).

Tabla 14:

Variaciones en la concentración del $MgCl_2$, en el coctel de la PCR según el protocolo de Rigotti *et al.*, (2002) con modificaciones.

REACTIVOS			1.5 mM de $MgCl_2$	3 mM de $MgCl_2$
	CI	CF	VOL. 1 rx (μ l)	VOL. 1 rx (μ l)
AGUA UP	-	-	3.1	2.80
BUFFER PCR (X)	10.00	1.00	1.00	1.00
$MgCl_2$ (mM)	50.00	3.00	0.30	0.60
dNTP's (mM)	2.50	0.10	0.20	0.20
Primers (μ M)	10.00	0.20	0.20	0.20
Taq polimerasa(U/ μ l)	5.00	0.10	0.20	0.20
MUESTRA (ng/ μ l)	5.00	2.50	5.00	5.00
Volumen de reacción (μ l)			10.00	10.00

CI = Concentración inicial CF= Concentración final

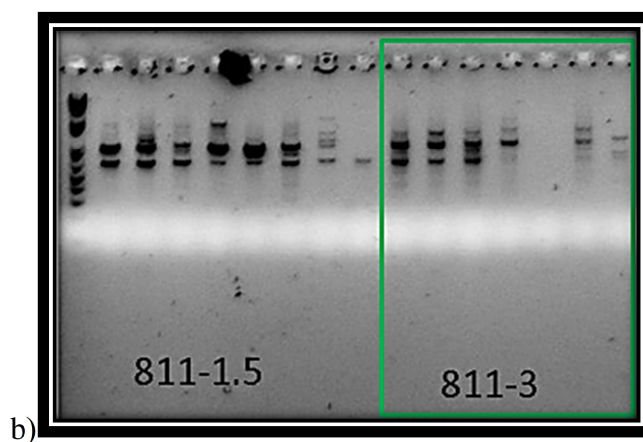
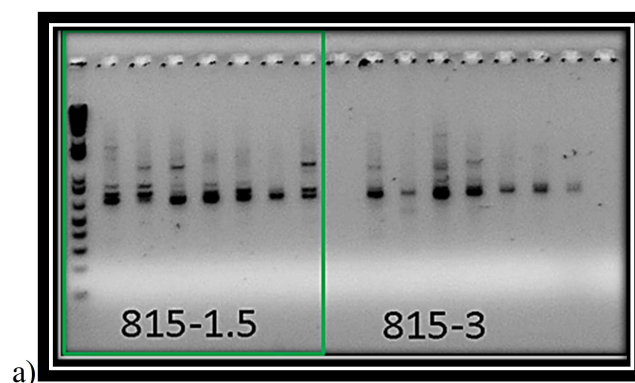


Figura 17: Amplificación de los marcadores ISSR presentando la mejor definición de banda el primer 815 a una concentración de 1.5 mM de MgCl₂ y el *primer* 811 a una concentración de 3 mM de MgCl₂.

Tabla 15:

Marcadores ISSR seleccionados y sus concentraciones de MgCl₂ escogidos.

ISSR	Concentración MgCl ₂ (mM)
807	1.5
811	3
812	1.5
815	1.5
835	1.5
836	1.5
844	1.5
848	1.5
849	1.5
873	1.5
HB12	3

3.3.2 Temperatura de alineamiento

Las temperaturas de *annealing* manejadas en el termociclador para los 11 *primers* fueron de 50°C (Naik *et al.*, 2009), y usando el *primer* HB12 se manejó a una temperatura de 37°C descrito por Rueda (2015) (Tabla 16).

Tabla 16:

Temperaturas de *annealing* de los marcadores ISSR en la amplificación del ADN de melina.

ISSR	Temperatura de <i>annealing</i>
807	50°C
811	50°C
812	50°C
815	50°C
835	50°C
836	50°C
844	50°C
848	50°C
849	50°C
873	50°C
HB12	37°C

3.4 Amplificación de ADN de melina (*G. arborea*) mediante los *primers* ISSR seleccionados

Una vez estandarizado el proceso de amplificación se procedió a realizar el experimento en las 51 muestras de ADN de melina (*G. arborea*) individualmente con los 11 *primers* seleccionados. Los marcadores moleculares ISSR amplificados se muestran en el anexo 4, a continuación se presentan algunos ejemplos de las amplificaciones realizadas (Figura 18).

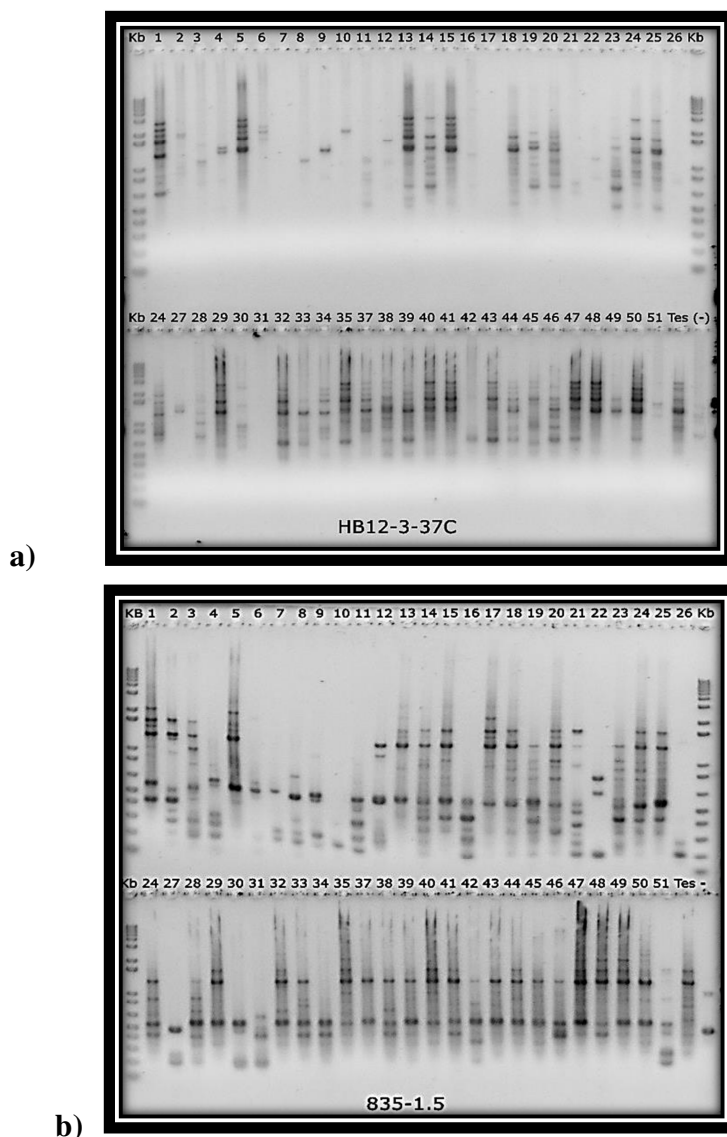


Figura 18: a) Primer HB12 con una concentración de 3 mM de $MgCl_2$ y una temperatura de 37°C; b) Primer 835 con una concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$. Amplificación de los primer HB12 y el primer 835; con las 51 muestras de la colección de melina. Carril Kb: marcador de peso molecular 1 Kb plus DNA *Ladder* de InvitrogenTM; Carril Tes: muestra testigo; Carril (-): muestra con agua Ultrapura.

Los geles obtenidos fueron fotografiados y se analizaron con la ayuda del software TotalLab 1D Versión 14.0. Este programa cuantifica la densidad de píxeles en cada muestra. Se identificaron el número de *loci*, tomando como referencia los

números de las pares de bases del marcador 1 Kb plus DNA *Ladder Marker* INVITROGENTM (ver anexo 8) (Figura 19). Se generó una matriz inicial con el número de pares de bases de cada banda con los 11 marcadores ISSR. Los datos se migraron a una matriz de Microsoft Office Excel (ver anexo 6) con las 51 muestras de *G. arborea* versus el número de *locus* con cada *primer*. Posteriormente, estos datos se transformaron a código binario siendo la presencia del alelo igual a un valor “1”, y su ausencia “0”. A los datos perdidos se le asignó un valor de “9” para modificaciones posteriores según las especificaciones de los programas bioinformáticos que se usaron en los análisis posteriores. Todos los análisis fotográficos de los 11 marcadores se encuentran disponibles en el anexo 5.

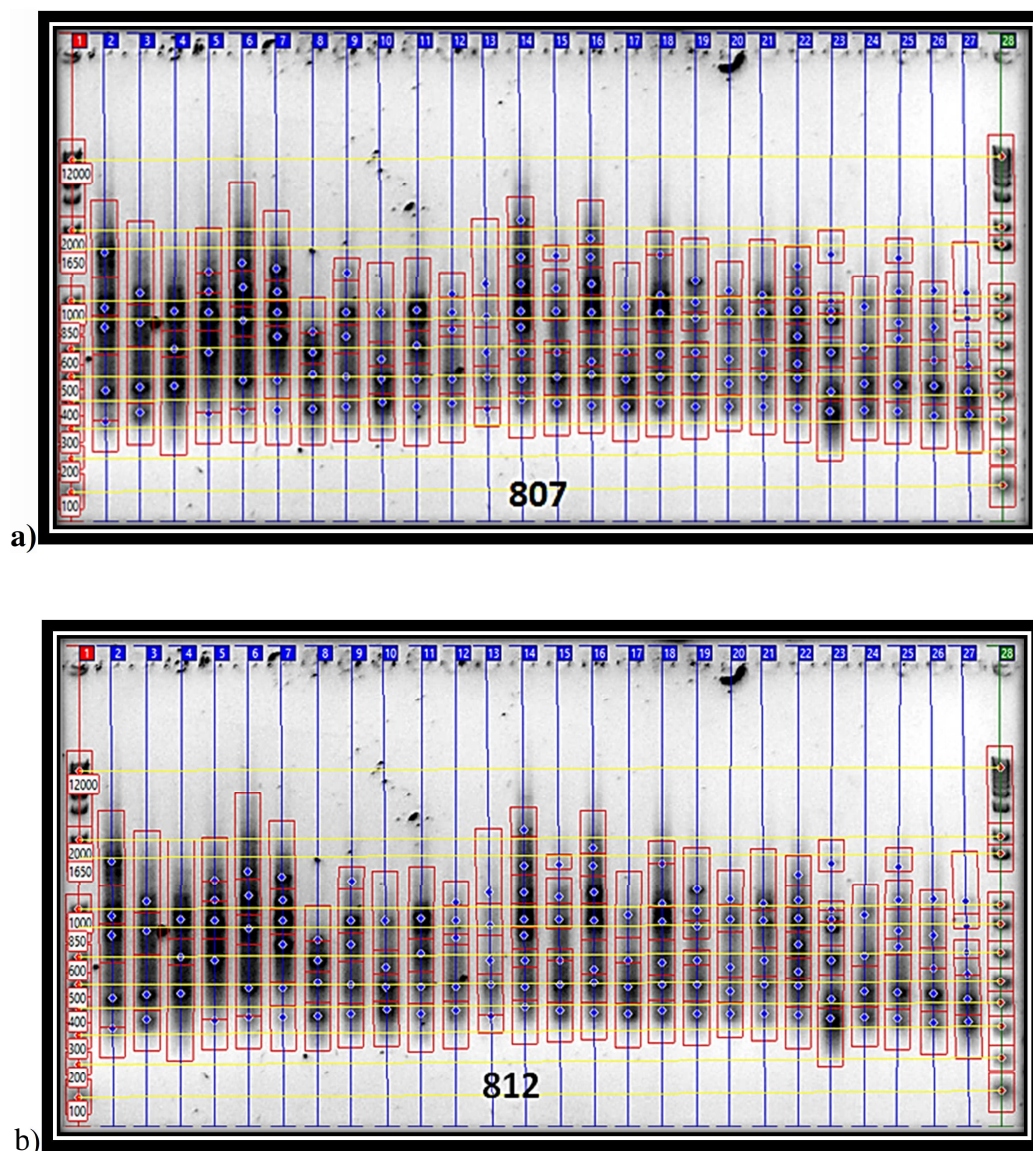


Figura 19: Análisis fotográfico de los *primers*: a) 807 y b) 812 en el software TotalLab 1D versión 14.0 cotejando con el número de pares de bases del marcador 1 Kb plus DNA Ladder Marker INVITROGEN™, siendo el carril 1 y 28 en las figuras a) y b).

3.5 Análisis de datos de toda la colección

3.5.1 Diversidad genética

Para el análisis de diversidad genética se consideró la colección compuesta por los 51 individuos de melina (*G. arborea*) con los 11 marcadores moleculares ISSR y

las expresiones cualitativas y cuantitativas que se derivan del análisis de la corrida electroforética. Se elaboró una matriz completa con sus respectivos valores en cada *locus*, detectándose 214 alelos con un promedio de 19.45 alelos/*loci*. Cada alelo tuvo un rango de longitud entre 318 a 3200 pares de bases (Tabla 17).

Tabla 17:

Detalle de *primers*: números de alelos y rangos de pares de bases.

ISSR	Número de alelos	Pares de bases	
		Menor	Mayor
807	22	253	3154
811	19	373	2615
812	20	212	1960
815	14	442	3489
835	24	140	3294
836	14	343	2070
844	20	214	2759
848	24	278	4035
849	16	346	3289
873	20	409	4448
HB12	21	490	4091
Total	214		
Promedio		318	3200
Número de alelos por <i>loci</i>	19.45		

Los locus de los marcadores ISSR 835 y 848 presentaron los mayores valores registrados con 24 alelos, mientras que en los locus de los marcadores ISSR 815 y 836 apenas se cuantificaron 14 alelos cada uno, siendo los valores más bajos dentro de este estudio (Tabla 17). Dentro de la frecuencia alélica, se analizó el marcador ISSR 844 que presentó el menor valor (0.13), al contrario del ISSR 849 con una frecuencia alélica de 0.24 (Tabla 18). Las frecuencias alélicas para cada primer con sus respectivos alelos se detalla en el anexo 7.

Tabla 18:

Frecuencias alélicas promedio de los marcadores ISSR.

Marcadores	Frecuencia alélica promedio por marcador ISSR
807	0.23
811	0.21
812	0.22
815	0.17
835	0.19
836	0.29
844	0.13
848	0.16
849	0.24
873	0.21
HB12	0.21
Promedio	0.21

Adicionalmente se calcularon el índice de Shannon, Heterocigosidad esperada (He) y heterocigosidad observada (Ho), así como otros valores importantes dentro de la genética poblacional con el software GenALEX versión 6.5 (Peakall & Smouse, 2012). El índice de información de *Shannon* tuvo su valor más alto de 0.49 para los *primers* ISSR 849 e ISSR HB12 y un valor mínimo de 0.33 para el primer ISSR 844; determinándose el promedio del índice de *Shannon* con el valor de 0.43. En el caso del porcentaje de polimorfismo, todos los marcadores presentaron un promedio de 82.04%. Por otro lado la Heterocigosidad esperada (He) tuvo el mayor valor de 0.32 para el *primer* ISSR 873 y el mínimo de 0.20 para los *primers* ISSR 844 e ISSR 848. La cantidad de muestras analizadas alcanzó un porcentaje promedio de 0.94 de disponibilidad, es decir las muestras presentes en la electroforesis, que amplificaron en la PCR. Finalmente tenemos una heterocigosidad observada promedio de 0.27 (Tabla 19).

Tabla 19:

Análisis de la diversidad genética de *G. arborea* con los 11 marcadores ISSRs.

Marcador	N	Na Freq. > = 5%	Ne	I	%P	D	PIC	He	Ho
ISSR 807	22	19	1.49	0.46	86.36	1.00	0.30	0.30	0.31
ISSR 811	19	18	1.50	0.48	94.74	1.00	0.31	0.31	0.32
ISSR 812	20	15	1.48	0.44	75.00	1.00	0.29	0.29	0.29
ISSR 815	14	9	1.40	0.38	64.29	0.84	0.22	0.24	0.25
ISSR 835	24	20	1.41	0.42	83.33	1.00	0.26	0.26	0.27
ISSR 836	14	13	1.42	0.44	92.86	0.90	0.28	0.28	0.28
ISSR 844	20	16	1.29	0.33	80.00	0.96	0.19	0.20	0.20
ISSR 848	24	14	1.30	0.34	58.33	0.80	0.18	0.20	0.21
ISSR 849	16	14	1.51	0.49	87.50	0.94	0.31	0.30	0.32
ISSR 873	20	16	1.44	0.42	80.00	0.92	0.26	0.32	0.27
ISSR HB12	21	21	1.48	0.49	100.00	0.96	0.31	0.27	0.32
Promedio	19.45	15	1.43	0.43	82.04	0.94	0.26	0.27	0.27

N= Número de alelos. Ne= Número de alelos efectivos. I= Índice de información de Shannon. %P= Porcentaje de polimorfismo. PIC= Contenido de Información Polimórfica. He= Heterocigosidad esperada o diversidad genética de Nei (1973). Ho= Heterocigosidad observada.

3.6 Análisis de agrupamiento de los Subgrupos

Se utilizó el programa NTSYSpC versión 2.02 para la generación de dendogramas basados en los promedios de similitud. Se introdujo la matriz completa y se generó el dendograma para los 51 individuos de melina con el coeficiente de asociación o similitud de *Jaccard*. En el dendograma se pudo distinguir que los agrupamientos de los genotipos no coinciden de acuerdo al lugar de procedencia (Figura 20). De igual manera se procedió con el coeficiente *Simple Matching* (Figura 21) y se realizaron las comparaciones correspondientes.

El análisis del UPGMA con *Jaccard* generó tres subgrupos A, B y C. El primer subgrupo A proviene de la Provincia de Limón cantón Matina y de la Provincia de Puntarenas cantón Buenos Aires (Costa Rica) basado en su sitio de origen, mientras

que los subgrupos B y C son muestras que provienen únicamente de la Provincia de Puntarenas cantón Buenos Aires (Figura 22). La distancia existente entre los puntos de la colección es de 102.52 Km (Figura 23). Mientras que en el análisis con el coeficiente *Simple Matching* se obtuvo 3 subgrupos A, B y C. El subgrupo A y C provienen de dos orígenes distintos: de la Provincia de Limón cantón Matina y de la Provincia Puntarenas cantón Buenos Aires (Costa Rica). El subgrupo B únicamente pertenecientes a la Provincia de Puntarenas cantón Buenos Aires (Costa Rica). Se diferenció este análisis usando el coeficiente *Simple Matching* que las muestras de la Provincia de Limón cantón Matina se dividieron en los 2 subgrupos ya mencionados (Figura 21).

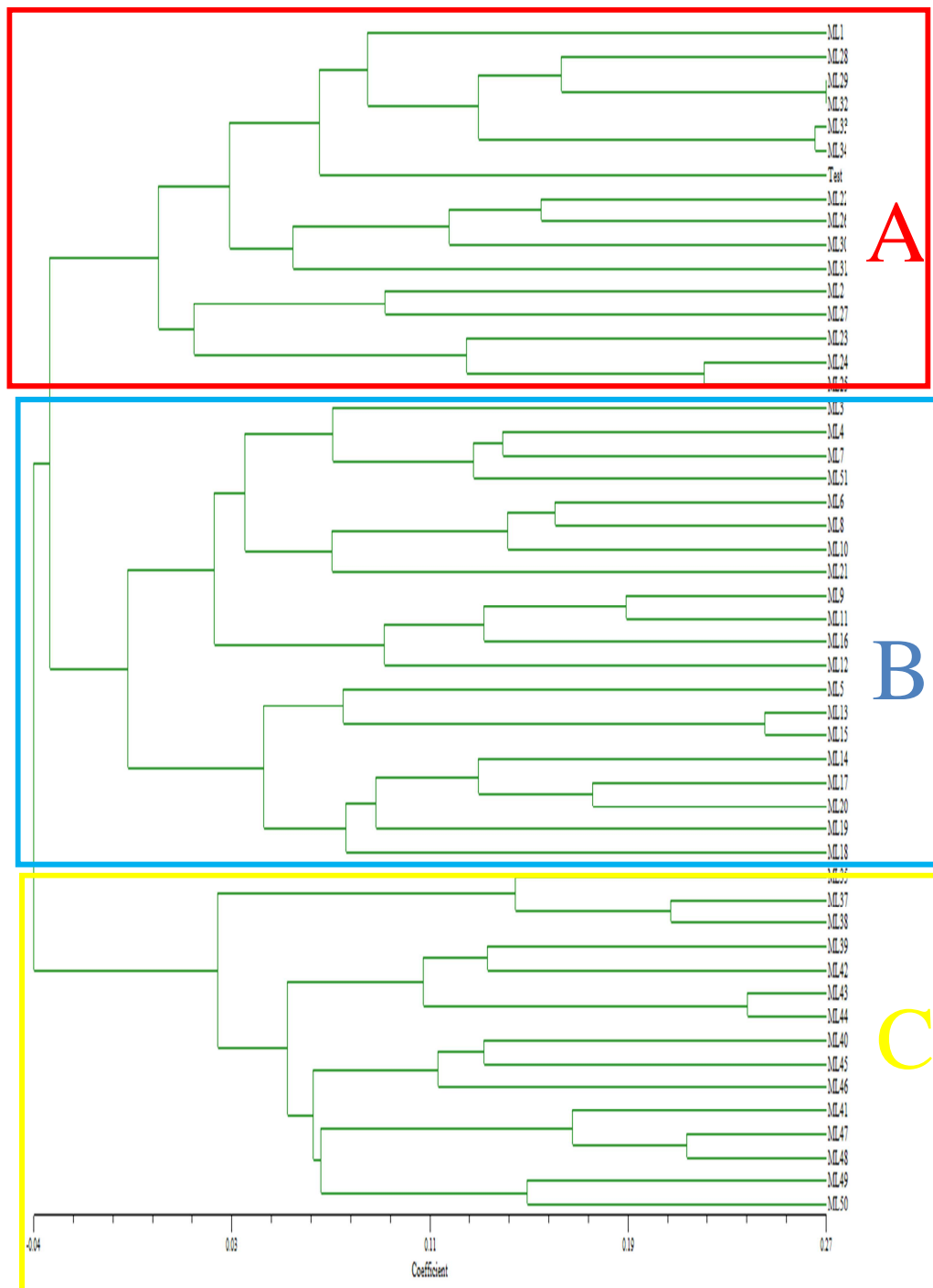


Figura 20: Dendrograma UPGMA para los 51 genotipos de melina con el coeficiente de similitud *Jaccard*, realizado en el programa NTSYS.pc versión 2.02. Representación de los grupos A, B y C que conforman a la colección de melina.

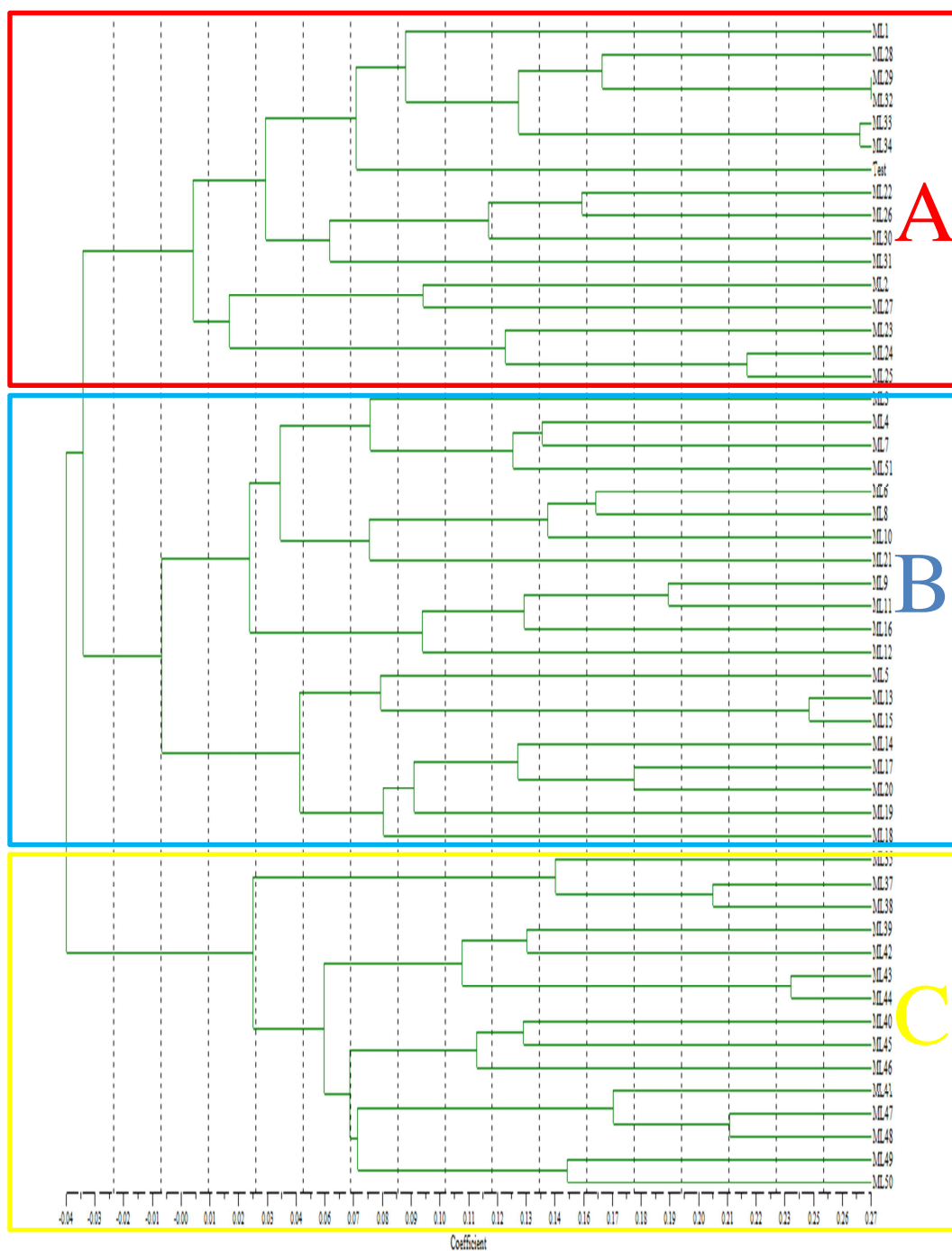


Figura 21: Dendrograma UPGMA para los 51 genotipos de melina con el coeficiente de similitud *Simple Matching*, realizado en el programa NTSYS.pc versión 2.02. Representación de los grupos A, B y C que conforman a la colección de melina.

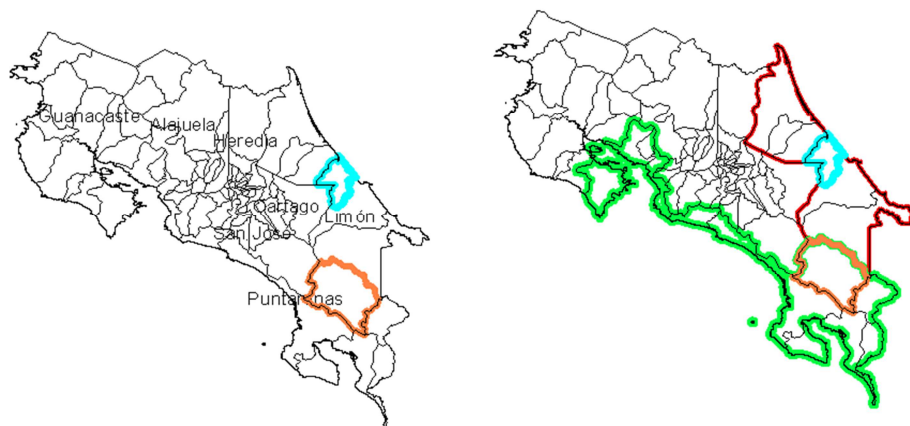


Figura 22: Provincias pertenecientes a la división política de Costa Rica, azul cantón Matina de la provincia de Limón (rojo) y café para el cantón Buenos Aires de la provincia Puntarenas (verde).

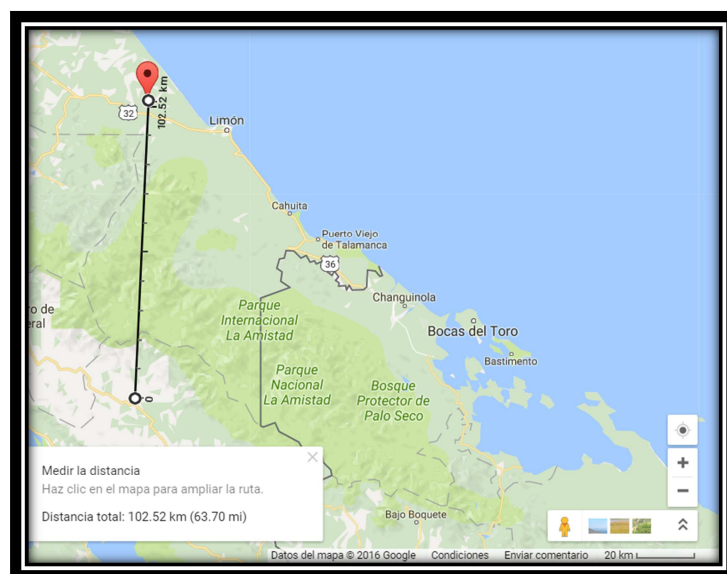


Figura 23: Distancia del cantón Matina de la provincia de Limón hasta el cantón Buenos Aires de la provincia Puntarenas.

Fuente: (Google maps, 2016).

3.6.1 Diversidad genética entre los subgrupos

Se realizó el Dendograma mediante el método UPGMA y se optó por el coeficiente de similitud de *Jaccard* para continuar con este análisis. Se analizó la

diversidad genética de cada subgrupo formado (A, B y C), y sus interacciones entre los mismos. Se mostró un número de alelos efectivos promedio de 1.36, el subgrupo B tuvo el mayor porcentaje de polimorfismo de 87.38% y el subgrupo C el menor porcentaje de polimorfismo 59.35%. El subgrupo B presentó el mayor índice de *Shannon* con un valor de 0.40, mientras que el menor valor fue de 0.28 para el subgrupo C. La heterocigosidad esperada (H_e) mostró un valor máximo de 0.26 para el subgrupo B y mínimo de 0.18 para el subgrupo C. Los dos subgrupos A y B mostraron un valor máximo de 0.27 de la heterocigosidad observada y un valor mínimo de 0.20 para el subgrupo C. La diferenciación genética (G_{ST}) promedio fue de 0.15 y el flujo genético (N_m) promedio fue de 2.83 (Figura 20).

Tabla 20:

Diversidad genética en los subgrupos de *G. arborea* estimadas utilizando los datos de los ISSR de 214 loci en los 3 subgrupos formados.

Subgrupos	Ae	%P	I	He	Ho	G_{ST}	N_m
A (Bloque 2)	1.39	82.24	0.38	0.25	0.27		
B (Bloque 1)	1.41	87.38	0.40	0.26	0.27		
C (Bloque 3)	1.29	59.35	0.28	0.18	0.20		
PROMEDIO	1.36	76.30	0.35	0.23	0.25	0.15	2.83

Ae= Número de alelos efectivos. **%P**= Porcentaje de polimorfismo. **I**= Índice de información de *Shannon*. **He**= Heterocigosidad esperada o diversidad genética de Nei. **G_{ST}** = Diferenciación genética. **N_m** = Flujo genético.

Los resultados presentados por la matriz ingresada, al programa POPGENE versión 1.32 (Yeh, 1997), mostró una alta heterocigosidad media de las subpoblaciones (H_s), para los dos subgrupos formados (A, B) y (B, C) que fue de 0.25, y una baja (H_s) para los subgrupos (A, C) que fue de 0.21. Se calculó la heterocigosidad de la población total (H_t) con un valor máximo de 0.28 para los subgrupos (A, B) y un mínimo de H_t para los subgrupos (B, C) que fue de 0.22. Adicionalmente, se evaluó la diferenciación genética (G_{ST}) con un valor máximo de 0.13 para los subgrupos (A, C) y un mínimo de G_{ST} para los subgrupos (A, B) que fue de 0.11. Finalmente, se calculó el flujo genético (N_m) con un valor máximo de

4.16 para los subgrupos (A, B) y un mínimo de Nm para los subgrupos (A, C) que fue de 3.42 (Tabla 21).

Tabla 21:

Agrupación de los Subgrupos.

Subgrupos	H _S	H _T	G _{ST}	Nm
A (Bloque 2)	0.25	0.28	0.11	4.16
B (Bloque 1)				
A (Bloque 2)	0.21	0.25	0.13	3.42
C (Bloque 3)				
B (Bloque 1)	0.25	0.22	0.12	3.74
C (Bloque 3)				

H_S= Heterocigosidad media de los Subgrupos. H_T= Heterocigosidad de la población total. G_{ST}= Diferenciación genética. Nm= Flujo genético.

El programa POPGENE versión 1.32 (Yeh, 1997) mostró resultados de la Heterocigosidad esperada (H_e) con un valor máximo de 0.08 para los dos subgrupos (A, B) y (A, C) y un valor mínimo de 0.07 para los subgrupos (B, C). Se determinó la identidad genética de Nei con valor mayor de 0.93 para los subgrupos (B, C), y un valor de 0.92 similar entre los subgrupos (A, B) y (A, C) (Tabla 22).

Tabla 22:

Matriz de distancia que representa las distancias genéticas entre los diferentes subgrupos de *G. arborea*.

	Subgrupo A	Subgrupo B	Subgrupo C
Subgrupo A	****	0.92	0.92
Subgrupo B	0.08	****	0.93
Subgrupo C	0.08	0.07	****

**** Diagonal: datos superiores identidad genética de Nei, datos inferiores distancia genética.

3.7 Métodos multivariados

Se analizaron las 51 accesiones de la colección de melina de la EELS-INIAP, mediante el Análisis de Coordenadas Principales (PCO) con el software NTSYSpc

versión 2.02 con el módulo Eigen (Rohlf, 2002). Se analizaron los principales ejes de varianza definidos por los valores Eigen. Se determinó en la primera coordenada un 6.43%, segunda coordenada 6.14% y tercera coordenada 4.12% individual, y un 22.43% acumulado de la variabilidad total (Tabla 23).

Tabla 23:

Valores Eigen y porcentajes individuales y acumulados de la varianza para las tres primeras coordenadas, de la colección de melina.

Coordenada	Valor Eigen	Porcentaje individual	Porcentaje acumulado
1	2.62	6.43%	6.43%
2	2.50	6.14%	12.57%
3	1.68	4.12%	16.69%

En la figura 24 se presenta el Análisis de Coordenadas Principales de todas las accesiones de la colección de melina. Este análisis separó en tres subgrupos genéticos: subgrupo A con 16 accesiones, subgrupo B con 20 accesiones y subgrupo C con 15 accesiones. Los siguientes pares de muestras pertenecen a subgrupos diferentes en relación al análisis de agrupamiento indicado entre paréntesis y se encuentran muy cercanas genéticamente: ML5 (B) y ML42 (C), Test (A) y ML37 (C), ML2 (A) y ML3 (B).

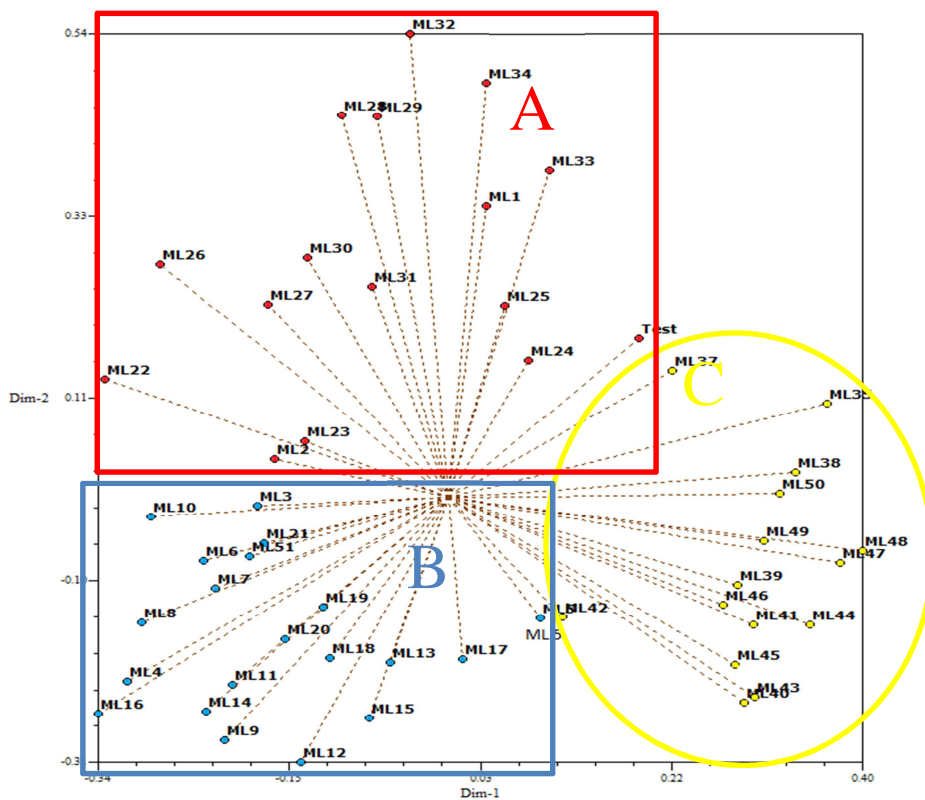


Figura 24: Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud de *Jaccard*, que indica la agrupación de las 51 muestras de melina, encontrándose con una subdivisión A (rojo), B (azul) y C (amarillo).

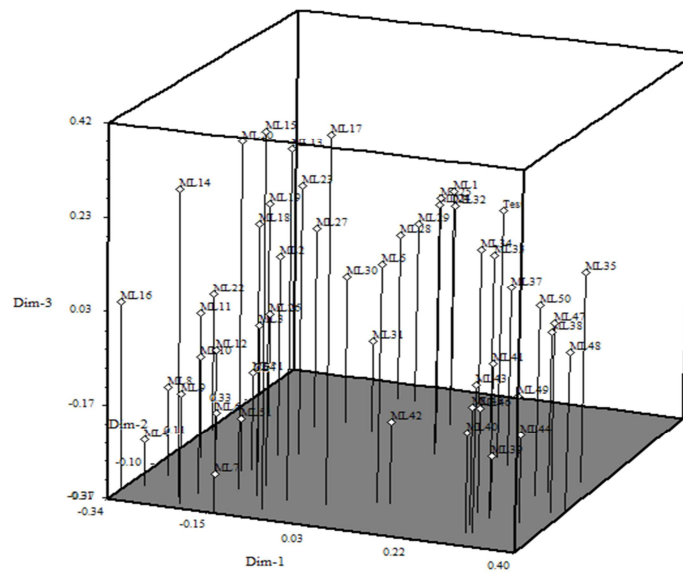


Figura 25: Análisis de coordenadas principales, en tres planos de los subgrupos A, B y C, con el coeficiente de similitud de *Jaccard*.

Se utilizó mediante el software NTSYSpc la opción 3D PLOT, (Figura 25) que permite analizar distribución espacial en tres dimensiones de las 51 accesiones en los tres subgrupos A, B y C. Se visualizaron las accesiones de su distribución genética en cada uno de los planos. El Análisis de Coordenadas Principales para la opción 3D PLOT usando el coeficiente de similitud *Simple Matching* nos dio otros resultados en comparación a la de *Jaccard* (Figura 26).

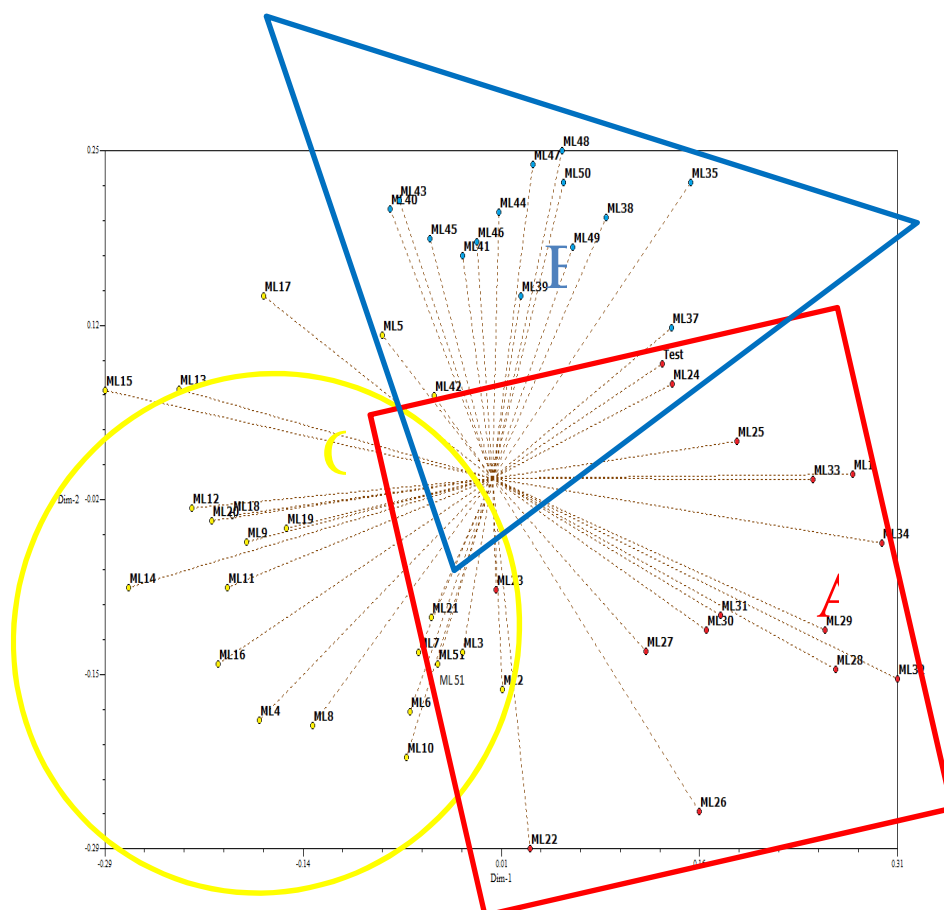


Figura 26: Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud de *Simple matching*, que indica la agrupación de las 51 muestras de melina, encontrándose con una subdivisión A, B y C.

3.8 Estadística F

Se analizó la estadística F para cada par de subgrupos en su agrupamiento (Tabla 24). Se obtuvo un valor bajo del 14% para el Fst.

Tabla 24:

Índice de diferenciación (Fst) en cada relación de Subgrupos encontrada.

Subgrupos	F _{ST}
A (Bloque 2)	0.09
B (Bloque 1)	
A (Bloque 2)	0.17
C (Bloque 3)	
B (Bloque 1)	0.16
C (Bloque 3)	

3.9 Análisis Molecular de varianza

En el análisis molecular de varianza (AMOVA) se obtuvo el índice de diferencia genética, ϕ_{st} , con un valor 0.15 entre las 3 subpoblaciones A, B y C. Se analizó que el 15% de la diversidad aporta a la diferenciación entre los subgrupos mientras que el 85% de la varianza está presente en cada uno de los subgrupos por lo tanto la mayor diversidad se encuentra dentro de cada subgrupo (Figura 27) y (Tabla 25). Se determinó la AMOVA entre los subgrupos formados: A y B, mostrando un porcentaje de variación del 9% entre los subgrupos y el 91% de variación dentro de los subgrupos (Figura 28), (Tabla 26). Entre los subgrupos A y C, se determinó que la variación fue del 17% entre los subgrupos y el 83% de variación dentro de los subgrupos (Figura 29), (Tabla 27). Entre los subgrupos B y C se determinó que la variación fue del 16% entre los subgrupos y el 84% de variación dentro de los subgrupos (Figura 30), (Tabla 28).

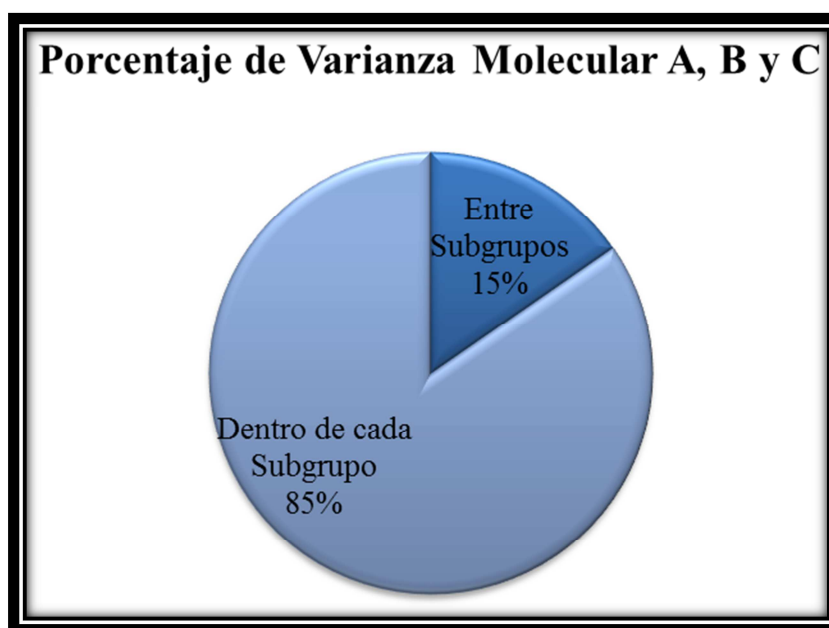


Figura 27: Análisis Molecular de Varianza de los tres subgrupos: A con 16 accesiones, B con 20 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.

Tabla 25:

Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A, B y C con los 11 marcadores ISSRs.

Origen de la variación	g.l.	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de varianza	% variación genética	ϕ_{st}
Entre poblaciones	2	214.06	107.03	4.79	15%	0.001
Dentro de cada población	48	1264.44	26.34	26.34	85%	0.15
Total	50	1478.50		31.13	100%	

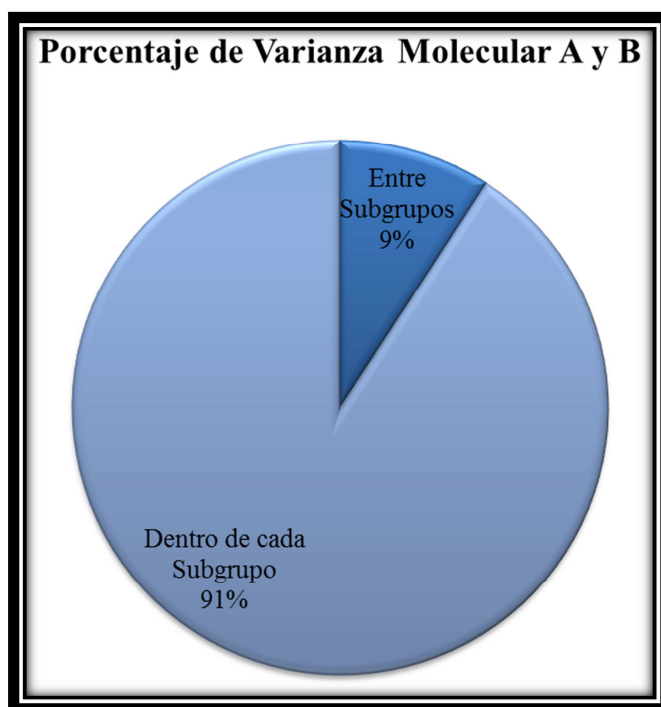


Figura 28: Análisis Molecular de Varianza de dos subgrupos: A con 16 accesiones y B con 20 accesiones, de la colección de melina.

Tabla 26:

Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A y B con los 11 marcadores ISSR.

Origen de la variación	g.l.	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de varianza	% variación genética	ϕ_{st}
Entre poblaciones	1	105.91	105.91	3.82	9%	0.002
Dentro de cada población	34	1289.68	37.93	37.93	91%	0.09
Total	35	1395.58		41.76	100%	

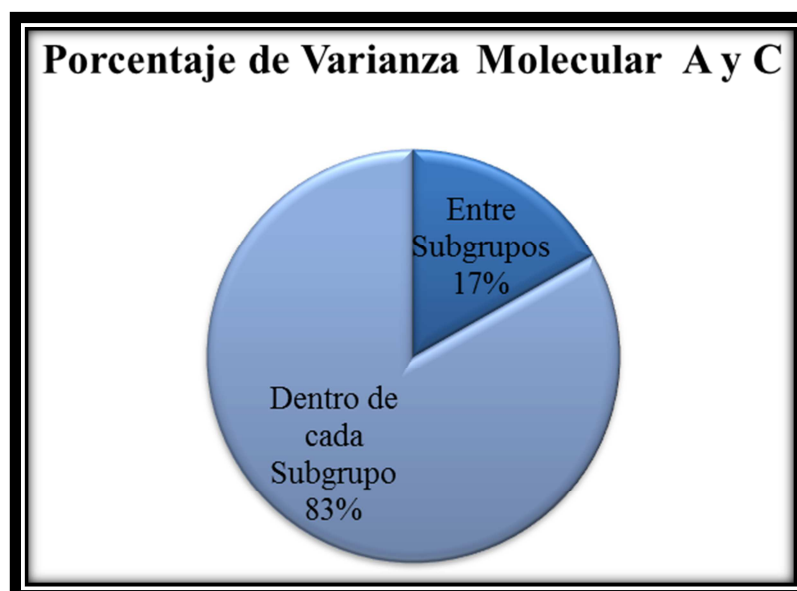


Figura 29: Análisis Molecular de Varianza de dos subgrupos: A con 16 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.

Tabla 27:

Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas A y C con los 11 marcadores ISSR.

Origen de la variación	g.l.	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de varianza	% variación genética	ϕ_{st}
Entre poblaciones	1	102.10	102.10	5.00	17%	0.001
Dentro de cada población	29	716.73	24.71	24.71	83%	0.17
Total	30	818.83		29.71	100%	

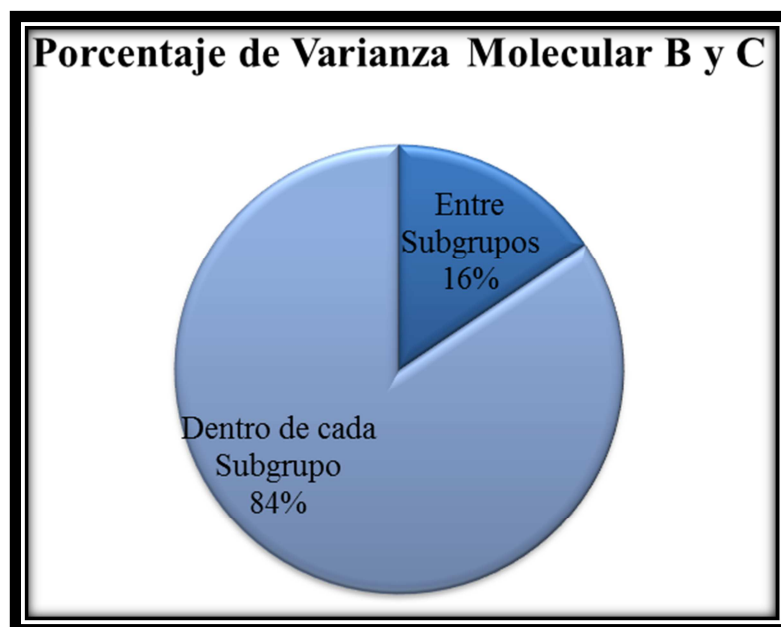


Figura 30: Análisis Molecular de Varianza de dos Subgrupos: B con 20 accesiones y C con 15 accesiones, de la colección de melina.

Tabla 28:

Análisis molecular de varianza de las tres subpoblaciones formadas B y C con los 11 marcadores ISSR.

Origen de la variación	g.l.	Suma de cuadrados	Promedio de cuadrados	Componente de varianza	% variación genética	ϕ_{st}
Entre poblaciones	1	105.85	105.85	4.69	16%	0.001
Dentro de cada población	33	839.41	25.44	25.44	84%	0.16
Total	34	945.26		30.13	100%	

3.10 Identificación de duplicados

Se identificaron duplicados según la cercanía genética de cada subgrupo como muestra en el dendograma UPGMA, presentando el mayor número de alelos emparejados el par ML 13 y ML 15 con 39 alelos, mientras que el par ML9 y ML 11 con tan solo 19 alelos emparejados (Tabla 29).

Tabla 29:

Identificación de duplicados de la colección de *G. arborea*.

MUESTRA 1	MUESTRA 2	NÚMERO DE ALELOS EMPAREJADOS	SUBGRUPO PROCEDENCIA
ML13	ML15	39	B
ML24	ML25	33	A
ML17	ML20	29	B
ML43	ML44	26	C
ML47	ML48	25	C
ML37	ML38	25	C
ML33	ML34	24	A
ML29	ML32	21	A
ML9	ML11	19	B

4. CAPÍTULO IV DISCUSIÓN

4.1 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN vegetal existen varios protocolos reportados, algunos comerciales y otros no. Se seleccionó el método no comercial (extracción sin kit), de acuerdo a las características del material y al número bajo de accesiones de *G. arborea* que iban hacer analizadas. El protocolo que se utilizó en la presente investigación está basado en el artículo de Souza *et al.*, (2012), mismo que cumple con los requerimientos para una óptima extracción de ADN del material vegetal, ya que presenta dos tampones: uno de extracción y otro de lisis. El tampón de lisis es selectivo para las membranas celulares por su alto contenido de EDTA (Ácido etileno diamino tetrácetico di sódico). El tampón de extracción por su parte, procesa los tejidos y elimina los inhibidores que afectan la PCR, ya que contiene CTAB (bromuro de cetil trimetil amonio) (Alejos, 2008). Melina es una planta que contiene una gran cantidad de metabolitos secundarios que complican el proceso de extracción de ADN. De manera general, el material procesado de las muestras de melina tuvo un aspecto viscoso por la presencia de mucílago, esto hace que el ADN sea difícil de pipetear y en algunos casos inamplificable en PCR por la inhibición de la actividad de la *Taq* polimerasa (Moreira, 2011; Tel-Zur, 1999; Fang, 1992). Con el empleo del protocolo de Souza *et al.*, (2012) se evitó la viscosidad con los lavados sucesivos de los productos de la extracción del ADN.

Se tomaron otras medidas para preservar el ADN. Se evitó el pipeteo y la agitación constante de las muestras para evitar la fragmentación de moléculas de alto peso molecular, por lo que se realizó durante el proceso una agitación suave por un periodo largo de tiempo (2 horas), a temperaturas bajas (37°C) (Alejos, 2008; Souza *et al.*, 2012). Adicionalmente el uso de ARNasas durante este proceso nos permitió obtener resultados positivos debido a que se colocaron en una solución de TE-ARNasa, siendo estas enzimas que cortan las secuencias de ARN para su posterior

degradación y evitar interferencias en la PCR (Nakagawa, 2010). Estas modificaciones metodológicas permitieron el éxito en la extracción del ADN de las muestras objetivo.

4.2 Calidad del ADN genómico

Con el protocolo de Souza *et al.*, (2012) se obtuvo una concentración promedio de 308.91 ng/μl en la colección de melina, y la relación de absorbancia 260/280, como indicador de pureza fue de 1.65. Este valor está cercano al óptimo de 1.8 (Zavala, 2005). Esta pequeña variación pudo deberse a la existencia de proteínas, fenoles y otros compuestos aromáticos en una proporción reducida, que no influyeron de manera directa en los procesos de amplificación y genotipaje (Sambrook, 2001). La importancia de obtener niveles altos de pureza en la extracción se debe a que la presencia de ADN extraño puede dar lugar a falsos positivos (Eppendorf Iberica, 2017): sin embargo, este trabajo no requirió una pureza y calidad alta de ADN debido a los marcadores moleculares seleccionados (ISSR). Los ISSRs requieren de concentraciones bajas de ADN (5ng/μl), lo cual inclusive permitiría ciertas impurezas (González y Aguirre, 2007). Sin embargo, el protocolo utilizado, ayudó a evitar la presencia de metabolitos secundarios, la adición del etanol y las soluciones solventes orgánicas con altas concentraciones de iones de sodio y amonio generan una mayor selectividad hacia el ADN “con ello se reduce las fuerzas repulsivas entre cadenas, lo que permite que el ADN se pliegue sobre sí mismo haciéndolo insoluble” (Alejos, 2008).

4.3 Validación del ADN de melina

La validación se realizó con el *primer* 824, ya que presentó 16 bandas polimórficas en el estudio de la “Evaluación de la diversidad morfológica y genética en *G. arborea* Roxb.”, un número alto reportado para el análisis de la diversidad genética (Naik *et al.*, 2009; Roxburgh, 1814), por lo tanto la integridad del ADN fue aceptable para esta especie, ya que en la PCR mediante ISSRs se necesita concentraciones bajas de ADN (5ng/μl) (González y Aguirre, 2007). Para la

validación se realizó dos amplificaciones de productos de PCR mediante el protocolo de Rigotti *et al.*, (2002) para completar la amplificación de todas las muestras. Los resultados permitieron obtener bandas definidas y sin degradación, ya que en el ADN no presento arrastre ni la formación de dímeros como se observa en las fotografías del gel de electroforesis (ver figuras 15 y 16).

4.4 PCR con el uso de marcadores ISSR

Los ISSRs han sido utilizados ampliamente en la caracterización genética en especies forestales debido a su alto nivel de polimorfismo, como lo demuestran los estudios en *Gmelina arborea* (Naik *et al.*, 2009), *Tabebuia billbergi* (Rueda, 2015), *Theobroma cacao* L. (Chia, 2009), *Caryodendron orinocense* K. (Morillo *et al.*, 2015), *Plantaginaceae* (Pérez *et al.*, 2010), *Nothofagus* (Gallo *et al.*, 2006), entre otros.

La *Taq* polimerasa utilizada en el presente estudio se validó con el primer 824. Se constató que dos concentraciones de $MgCl_2$ sirvieron en el proceso de amplificación, debido a que los iones de magnesio ayudan al correcto funcionamiento de la *Taq* polimerasa en la síntesis a partir de cadenas simples de ADN en presencia de dNTPs y un *primer*. La concentración de 1.5 mM de $MgCl_2$ fue efectiva para 9 *primers*, y solo 2 *primers* amplificaron con la concentración de 3 mM de $MgCl_2$. El rango de concentración según Espinosa (2007) es de 1 a 4 mM de $MgCl_2$, además explica que una concentración baja puede generar productos inespecíficos, y una concentración alta inhibe a la polimerasa. Otro aspecto que se analizó en esta investigación fue la temperatura de *annealing*. La unión del *primer* con los sitios complementarios en el ADN templado, se lleva a cabo a una temperatura adecuada, esta temperatura debe ser estable para que la polimerasa pueda iniciar la síntesis.

Cuando la temperatura de alineamiento es menor a la establecida, la especificidad de la PCR es baja, si la temperatura es alta la especificidad será mayor; pero si es demasiado alta no amplificará y por lo tanto no se tendrá ningún resultado.

Esto hace que el proceso de estandarización sea fundamental. Mantener la temperatura de *annealing* para generar la reproducibilidad y unos resultados correctos en la investigación (Espinosa, 2007). La temperatura de alineación se basa en la temperatura de fusión (*melting*), que se refiere a la temperatura a la que se hibridan los *primers* depende de los oligonucleótidos, presentes con dobles o triples enlaces de hidrógeno, la Timina y Adenina que se unen con doble enlace, y Guanina y Citosina con triple enlace de acuerdo a las Leyes de Chargraff. Esta temperatura se calcula con la fórmula $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ donde se reemplaza los valores presentes de cada nucleótido del *primer* en la fórmula. También la temperatura de *annealing* está influenciada directamente por los iones y otras sustancias presentes en la reacción, pero se necesita probar experimentalmente hasta encontrar la temperatura óptima, comprobando la definición de bandas en las fotografías obtenidas con el fotodocumentador para los marcadores ISSR (Entrala, 2000). La temperatura de *annealing* fue manejada en esta investigación para los 10 *primers* a 50° C, siguiendo los resultados obtenidos por Naik *et al.*, (2009) y apenas un solo *primer* (HB12) reportado por Rueda (2015) presentó su temperatura de *annealing* de 37° C.

4.5 Amplificación

Se realizó la amplificación de los *primers* según el protocolo de Rigotti *et al.*, (2002) con el programa térmico de la PCR con algunas modificaciones: la temperatura de 94°C a 92°C, el tiempo de 2 a 4 minutos en la desnaturalización inicial con 1 ciclo, para que la desnaturalización sea no violenta disminuyendo la temperatura y aumentando el tiempo de exposición, el tiempo de 30 segundos a 1 minuto en el apareamiento, para que el alineamiento de oligonucleótidos con la *Taq* polimerasa, sea más estable, finalmente con un aumento de 35 a 40 ciclos en la segunda etapa de la PCR, para aumentar la concentración de los fragmentos amplificados en forma exponencial (Espinosa, 2007). Se eligió 11 *primers*, que presentaron bandas claras y definidas, y polimorfismo que concuerda con otros estudio, demostrándose válido. Según Naik *et al.*, (2009) en un estudio de “Evaluación morfológica y la diversidad genética en *G. arborea* Roxb.” se

reportaron los 10 *primers* utilizados en este estudio. Adicionalmente el primer HB12 reportado por Rueda, (2015) para la especie *Tabebuia billbergi* resultó también altamente polimórfico, reproducible e informativo para *G. arborea* (Gallo *et al.*, 2006). Este estudio demuestra que los *primers* universales ISSRs son una buena técnica para la generación de información genética básica. Así como la gran capacidad de reproducción que tienen, ya que se usaron los mismos *primers* que estudios previos.

4.6 Análisis de la diversidad genética para toda la colección

En el estudio de la diversidad genética de toda la colección de melina con los diferentes *primers* se determinó: la frecuencia alélica, el contenido de información polimórfica (PIC) y su disponibilidad. Con el uso de los marcadores ISSR, se evidenció el número de alelos por locus que fue de 19.45 alelos/*locus*, un valor mayor respecto al promedio de 10.88 alelos/*locus* encontrado en un estudio previo (Naik *et al.*, 2009), pero fue un valor más cercano al de 16.40 alelos/*locus* encontrado por Wee *et al.*, (2011) en un estudio de 534 muestras de melina con 10 *primers* marcados con un fluoróforo y genotipados en un secuenciador ABI 3730XL. La variabilidad cercana a la presentada en el estudio de Wee, se debe probablemente a que en esta investigación se tomaron muestras de la Estación Experimental del Litoral Sur, pero de procedencia de Costa Rica, cuya variabilidad genética se explicaría debido a que los agricultores seleccionan los árboles sobresalientes en los bosques naturales de melina a nivel mundial que provienen originalmente la India y grandes partes del Sudeste Asiático, al igual que el estudio de Wee que tiene muestras de diferentes procedencias como son India, China, Tailandia y Myanmar (Wee *et al.*, 2011). Estos resultados comprueban la importancia genética de los progenitores dentro de procesos forestales. Los datos obtenidos corroboran que el material ingresado al Ecuador tenía las condiciones genéticas necesarias para iniciar un proceso forestal exitoso.

Los *primers* ISSR 807, 835, 848 y HB12 fueron los que más alelos amplificaron, por lo que se recomendaría su uso para determinar la huella genética de árboles de

melina en futuros estudios. Este resultado es corroborado con otros estudios realizados por Naik *et al.*, (2009), Rueda, (2015) y Sena *et al.*, (2012) donde reportan los *loci* 811 y HB12, como los más polimórficos, apoyando el uso de estos marcadores dentro de genotipaje molecular.

La Heterocigosidad esperada promedio en este estudio fue de 0.27, lo que representa una variabilidad genética media. Este resultado es similar con valores de diversidad genética encontrándose en investigaciones previas mediante ISSRs, 0.29 para materiales de bosques naturales y plantaciones controladas (Naik *et al.*, 2009), lo cual muestra un resultado consistente con las investigaciones previas. Sin embargo los resultados de Wee *et al.*, (2011) presentan un valor medio de 0.89, completamente diferente, debido a que son seleccionados de poblaciones totalmente naturales.

Se obtuvo el Contenido de Información Polimórfica (PIC) con un valor promedio de 0.26, valor menor al encontrado por Liao *et al.*, (2008), 0.55, cuando se determinó la diversidad genética con 11 ISSRs (marcadores) en 24 muestras de *Gmelina arborea*. El valor obtenido (0.26) indica que en la colección existe un parentesco bajo, la información que aporta no es suficiente para elegir uno u otro marcador de la tabla de resultados (ver tabla 19). Sin embargo, el valor más alto de PIC fue de 0.31 con los *loci* 811, 849 y HB12.

La Heterocigosidad esperada (He), el Contenido de Información Polimórfica (PIC) y el número de alelos se correlacionan positivamente. Se trabajó toda la colección siguiendo los lineamientos del equilibrio Hardy – Weinberg (González y Aguirre, 2007). El *primer* con menor disponibilidad fue el 848, con 0.8, es decir que no se pudo amplificar en un 100%, sino solamente en un 80%, pero se utilizó estos marcadores debido a que se evidenció tenían un alto polimorfismo y bandas claramente definidas, independiente de que no amplificaron algunas muestras. Los resultados de la investigación fueron favorables, para encaminarse hacia el mejoramiento genético, la colección de Melina en el Ecuador presenta una variedad

genética moderada. Estos resultados son la base para encontrar características que incrementen la productividad.

La Heterocigosidad observada (H_o) promedio en este estudio fue de 0.27, este valor es intermedio, debido a que estudios como los de Wee *et al.*, (2011) presentaron valores de 0.56, o el caso de Liao *et al.*, (2008) con valores de 0.50; previos estudios se realizaron en individuos naturales del sudeste asiático e Indonesia. Sin embargo, la heterocigosidad observada en los *primers*, se aceptan con valores mayores al cero (0.05), para determinar la significancia de heterocigocis, debido a que podría haber la presencia de alelos nulos, es decir no se visualizan, mismos que disminuyen la heterocigosidad observada (Herrero, 2000).

4.7 Análisis de agrupamiento y la diversidad genética de los subgrupos

Se analizó los datos con el Dendograma UPGMA, donde se comparó dos coeficientes de similitud: el coeficiente de similitud *Simple Matching*, que no diferencia el orden de presencia y ausencia de las muestras; y el coeficiente de similitud de *Jaccard* que diferencia positivamente el orden de presencias y ausencias de cada muestra en sus *loci* (Dalirsefat, 2009). Hay que tomar en cuenta que, los organismos están con una predisposición a ser especies cercanas, puesto que todas las muestras proceden del país Costa Rica, es por ello que se optó por el coeficiente de similitud de *Jaccard* para el análisis de agrupamiento. Se determinó un valor medio del coeficiente de similitud de *Jaccard* (0.01) entre los extremos iniciales encontrados, así los *loci* compartidos son bajos, porque el rango del coeficiente tiende a cero (Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humbolt, 2004). Luego de realizar los análisis de agrupamiento UPGMA y el análisis de coordenadas principales se encontró dos grupos: el primer grupo conformado por los subgrupos A y B, y el segundo el subgrupo C correspondientes a los 3 bloques de colecta de muestras.

Es decir, en la estación experimental existieron 3 bloques, en el momento de la siembra, esta subdivisión coincide con los subgrupos formados en el dendograma. En

el subgrupo A hubo la presencia de las muestras del cantón Matina, provincia de Limón (Costa Rica), los grupos B y C pertenecieron al cantón Buenos Aires provincia de Punta Arenas (Costa Rica) con una presencia del 100%. La distancia entre el cantón Matina y el cantón Buenos Aires es de 102 km. Las relaciones de distancia observadas de los subgrupos A y B son muy próximas, mientras que el subgrupo C está más alejado. Además analizando la dispersión en el Análisis de Coordenadas Principales, el subgrupo A es mayor, seguido del subgrupo B, mientras el subgrupo C es más homogéneo y sus muestras están a una distancia similar.

Los resultados del análisis de coordenadas principales se evaluaron incluyendo muestras con genotipos de los demás bloques, dos genotipos del bloque 3 (ML37, ML42), una del bloque 2 (Tes) y una del bloque 1 (ML5). Aunque éstas pertenezcan a diferentes subgrupos, se encontraron próximas (ML37, Tes) y (ML42, ML5), en el plano. No existieron barreras naturales que generen aislamiento, teniendo en cuenta que sus procedencias son de diferentes sitios, pues los resultados son consistentes con las distancias geográficas para que exista un flujo de genes (Wee, 2011). Se estableció el índice de *Shannon* como un marcador de diversidad específica el valor promedio fue de 0.35, este valor es bajo (Pla, 2006). En el estudio de Naik *et al.*, (2009) la diversidad genética de melina mostro un índice de *Shannon* de 0.17, mostrando que es la mitad del resultado obtenido. Esto se debe a que se realizó el análisis en plantaciones controladas aumentando su parentesco, mientras que este estudio se da una plantación no controlada.

Debido a la morfología de la flor, no existe autopolinización (Rojas 2004), por lo que las muestras serían el producto de polinizaciones cruzadas sexuales del grupo de árboles a su alrededor, con ayuda de los vectores zoófilos (Pla, 2006). Estos valores se calcularon relacionando los tres subgrupos A, B y C, donde el valor de la Heterocigosidad esperada (H_e) de los tres subgrupos fue de 0.23. Comparando con el estudio realizado por Naik *et al.*, (2009), que fue un estudio también de diversidad genética de melina, el mismo presentó un valor de la Heterocigosidad esperada de 0.12, indicándose que hubo poblaciones pequeñas. Este valor, indica que hubo una selección de árboles por los agricultores, con las mejores características. El nivel de

diferenciación genética (G_{ST}), de los tres subgrupos fue de 0.15. Naik *et al.*, (2009) en su estudio obtuvo un valor de 0.60 indicando un aislamiento.

Se observó un bajo nivel de diferenciación génica en las especies de melina, lo que indica que los subgrupos (A, B y C) no se sometieron a un estricto aislamiento genético. El flujo de genes (Nm), de los tres subgrupos fue de 2.83. Comparando con Naik *et al.*, (2009), que obtuvo un valor del flujo genético de 0.34. Como consecuencia, el flujo estimado de genes entre las poblaciones fue alto. Estos resultados pueden deberse a que hubo una preselección de las especies, con enfoque en la producción forestal maderable para un futuro uso comercial. Se determinó los valores de la Heterocigosidad media de los subgrupos $H_S=0.24$, se analizó la Heterocigosidad esperada (H_e) con un valor de 0.08 y el estadístico F_{st} que presentó la correlación de genes individuales con la colección total, presentó un valor de 0.09 (Piñero, 2008). Por tanto, el subgrupo A presenta la mayor diversidad genética con respecto a toda la colección, con lo cual se determinó que estos subgrupos proceden de una o muy pocas líneas genéticas comunes.

4.8 Análisis molecular de varianza

El Análisis molecular de varianza conocido como AMOVA, calculado para determinar las diferencias entre los subgrupos formados. Se calculó el valor de ϕ_{st} en 0.15. Se determinó que la mayor diversidad genética está presente dentro de los tres subgrupos con un valor del 85%, mientras que el 15% de variabilidad genética se halla entre los subgrupos. El estudio desarrollado, presentó una diversidad genética mayor que en el estudio de Wee *et al.*, 2011, donde la diversidad genética en poblaciones naturales de *G. arborea*, dentro de las poblaciones obtenía un valor del 69%, y un valor del 31% entre las poblaciones. Se analizó adicionalmente la diversidad genética de los tres subgrupos relacionados A con B, A con C. Finalmente B con C, presentando la mayor diversidad genética con un valor del 91%, entre los subgrupos A y B analizados. Según Wee *et al.*, (2011) también existió una división de grupos, existiendo un grupo que con un valor de la diversidad dentro de las poblaciones de 94.75% y entre las poblaciones 5.25% esto nos informa que la

diferenciación genética se encuentra dentro de las poblaciones y sus regiones. La baja diversidad entre los subgrupos en el análisis molecular de varianza indica una procedencia similar, con un valor del 15%. Si se toma en cuenta que las flores de melina favorecen la alogamia (De Vicente y Fulton, 2004; Bowen, 2016), esto puede acentuar la diversidad dentro de las poblaciones, disminuyendo la diversidad entre poblaciones. Se debe considerar que debió haber existido algún criterio al seleccionar a los mejores individuos para reforestar los bosques de Costa Rica, mismos que posteriormente fueron trasladados hacia Ecuador.

4.9 Identificación de duplicados de la colección de *G. arborea*

Otra aplicación de los marcadores moleculares es la identificación de duplicado. La elección de muestras según su fenotipo produce complicaciones que se solucionan con el diagnóstico basado directamente en el ADN (Sánchez *et al.*, 2005). En este estudio se encontró 3 pares de muestras duplicadas en cada subgrupo. Las muestras ML13 y ML15 presento 39 alelos emparejados perteneciente al subgrupo B, mientras que las muestras ML 9 y ML 11 presentaron un número de 19 alelos emparejados del mismo subgrupo, de los 9 pares de muestras emparejadas en toda la colección. Toda la información generada ha permitido demostrar que existe una variabilidad aceptable entre la colección de la Estación Experimental Litoral Sur, por lo que con esta variabilidad se podría obtener mejores resultados en relación a árboles grandes de rápido crecimiento y que no sean afectados por plagas (Dvorak, 2004). Por tanto esta investigación resultará de mucha utilidad para futuros proyectos de identificación de la especie melina, utilizando la diversidad genética para la clonación en masa, que beneficie al sector forestal e industrial. Se tiene que recalcar además que las pruebas se determinaron con la ayuda de duplicados, que permitan realizar una conservación de alelos que se encuentren en bajas frecuencias, disminuyendo las inversiones económicas en los procesos de mantenimiento de los diferentes individuos forestales (Sánchez *et al.*, 2005).

5 CAPÍTULO V CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN genómico desarrollado por Souza *et al.*, (2012) utilizado en *Gmelina arborea*, generó un ADN buena calidad y cantidad para su amplificación con los marcadores ISSRs.

A partir de los estudios realizados en este trabajo se logró caracterizar la diversidad genética de las 51 accesiones de la colección de *G. arborea* perteneciente a la EELS-INIAP Utilizando 11 marcadores ISSR se determinó un valor promedio de 19.45 alelos / *loci*, el contenido de información polimórfica (PIC) de 0.26, la heterocigosidad esperada 0.27 y un polimorfismo 82.04% para cada *primer*. Esto demuestra que existe una variedad genética moderada, relacionado con los estudios previos realizados en este trabajo.

Se determinó 3 subgrupos formados mediante el análisis UPGMA con el índice de similitud de *Jaccard*, en el subgrupo A hubo la presencia de muestras tanto del cantón Matina con del cantón Buenos Aires, mientras que en los subgrupos B y C solo la presencia de muestras del cantón Buenos Aires, procedentes de Costa Rica.

Los análisis de agrupamientos realizados determinaron un importante rol en el origen geográfico de las muestras ya que la principal discriminación se basó si venían del cantón Matina o del cantón Buenos Aires en Costa Rica.

Con el análisis de coordenadas principales se observó que el grupo C presentó la mayor homogeneidad genética así como la distancia en relación a los otros grupos. Mientras que el subgrupo A presentó la mayor dispersión (variación genética) en el plano.

Se analizaron los subgrupos con los siguientes valores, el índice de *Shannon* 0.35, la Heterocigosidad esperada 0.23, la diferenciación genética 0.15 y el flujo

genético 2.83, esto indica que las plantaciones procedentes de Costa Rica, no se encontraron aisladas comparándolas con estudios similares.

La mayor diversidad genética presentó el subgrupo B, ya que tuvo valores altos de heterocigosidad como de diversidad, con respecto a toda la colección, por lo que se podría decir que procede de una o muy pocas líneas genéticas comunes.

La mayor diversidad genética se encontró dentro de los subgrupos con un 85% y entre los subgrupos con un 15%, considerando líneas parentales comunes, acentuando los fenotipos para la selección de los mejores individuos.

Se determinó los duplicados genotípicos, el subgrupo B presentó la más alta tasa de duplicados en número de alelos, en futuras conservaciones de las accesiones se debería tomar en cuenta su importancia fenotípica.

Los datos obtenidos afirman que las muestras ingresadas al Ecuador, procedentes de dos sitios diferentes de Costa Rica, poseen una buena variabilidad genética para seguir con investigaciones del mejoramiento genético en *Gmelina arborea*.

6 CAPÍTULO VI RECOMENDACIONES

Se recomendaría la utilización de los *primers* 807, 835 y HB12, ya que presentaron un polimorfismo adecuado para la determinación de la huella genética de árboles de *Gmelina arborea* en posteriores investigaciones.

Se recomienda complementar la información molecular obtenida en esta investigación por el programa de Forestería del INIAP, con la información morfoagronómica de la colección de *Gmelina arborea* perteneciente a la EELS – INIAP, para identificar fenotipos con características buscadas, para implementar programas de mejoramiento.

Al conocer la variabilidad genética encontrada en la colección de *Gmelina arborea* de la Estación Experimental Litoral Sur, mediante el empleo de ISSRs, se sugiere establecer un programa para generar especies con un alto rendimiento para la producción de madera a nivel Nacional.

Realizar una base de datos de la diversidad genética de árboles forestales entre ellos de *Gmelina arborea* solamente con el uso de marcadores ISSRs, como herramienta en la toma de decisiones a nivel comercial.

Se debería estimar en trabajos futuros la tasa de fecundación cruzada en el País, utilizando marcadores más variables como los, AFLPs e ISSRs.

7 CAPÍTULO VII

BIBLIOGRAFÍA

- Alejos, L. A. (2008). Extracción y purificación de ADN. 1-26.
- Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., & Rocha, O. (2005). Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. 2(6):1-14.
- Asociación Ecuatoriana de Productores de Teca y Maderas Tropicales. ASOTECA. <http://www.asoteca.org.ec/semilla-certificada-de-teca-y-melina/>:
[Recuperado el 17/05/2017]
- Bowen, M. E. (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Estudios de *Gmelina arborea* sobre la floración y las semillas. <http://www.fao.org/docrep/006/q5987s/Q5987S11.htm>: [Recuperado el 21/11/2016]
- Casalla, R. (2003). Medición de distancias genéticas en poblaciones de camarón blanco *Litopenaeus vannamei* en la costa Ecuatoriana. Guayaquil.
- Chatha, G. B. (1988). Cytology and distribution pattern of woody species of Vebenaceae in *Palni hills*. Proceedings: Plant Sciences, 139 - 148.
- Chavarria, M. V. (1993). Guía preliminar de parámetros silviculturales para apoyar los proyectos de reforestación en Costa Rica. Dirección General Forestal. Mirenem, 202.
- Checa, M. (2007). Polimorfismos genéticos: Importancia y aplicaciones. México: Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas.
- Chia, J. (2009). Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clonales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS -Tingo María. Lima.

- Cornelius, J. M. (1994). Manual sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central. Turrialba: Catie.
- Cuadras, C. (2014). Nuevos métodos de análisis multivariantes. Barcelona: CMC.
- Dalirsefat, S. M. (2009). Comparison of Similarity Coefficients used for Cluster Analysis with Amplified Fragment Length Polymorphism Markers in the Silkworm, *Bombix mori*. Journal of Insect Science, 1 - 8.
- De Vicente, M., & Fulton, T. (2004). Tecnologías de marcadores moleculares para estudios de diversidad genética de plantas: Módulo de aprendizaje.
- Diaz, L. (1997). Turno forestal económicamente óptimo: Una revisión. Economía Agraria, 181 - 224.
- Dvorak, W. (2004). World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges. New Forests, 111 - 126.
- Entrala, C. (2000). Técnicas de análisis del ADN en genética forense. <http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/forensetec.htm>: [Recuperado el 19/08/2016]
- Eppendorf Iberica. Importancia de los grados de pureza. <https://www.eppendorf.com/ES-es/servicios-soporte/calidad-y-reglamentacion/grados-de-pureza/importancia-de-purezas/>: [Recuperado el 18/01/2017]
- Espinosa, L. (2007). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Ecología Molecular, 517-540.
- Estévez, C. (2009). Estudio Sobre la Caracterización Genética de las razas Caprinas *Mallorquinae ibicenca*. Córdoba: Universidad de Córdoba.
- Fang, G. H. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. Biotechniques, 52-56.

- Gallo, A. M. (2006). El uso de marcadores genéticos en el género *Nothofagus* con especial referencia a raulí y roble. *Bosque*, 3 - 15.
- González, A., & Aguirre, X. (2007). Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *Ecología Molecular*, 567-572.
- González, F. Evaluación e interpretación de resultados en caracterización molecular. http://fernando.gonzalez.unileon.es/web_mex14/presentaciones_teoría/lección_4.pdf: [Recuperado el 12/11/2016]
- Google maps. (2016). Buscar en Google maps. <https://www.google.com.ec/maps/@5.181755,-79.3556377,364270a,20y,309.95h,60.2t/data=!3m1!1e3>: [Recuperado el 05/12/2016]
- Herrero, J. R. (2000). Marcadores moleculares de ADN y su aplicación en frutales.
- Hijmans, R. G. (2004). Sistema de Información Geográfica para el Análisis de Datos de Distribución de Especies. California.
- Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. (2004). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. Manual de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad, 188 - 225.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2015). Estación Experimental Litoral Sur. http://www.iniap.gob.ec/nsite/index.php?option=com_content&view=article&id=37&Itemid=16: [Recuperado el 16/06/2016]
- León, J. (2000). Papel de la vegetación en la estabilidad de taludes y laderas. Estudio y control de la erosión hídrica, 40-55.
- Liao, M. C. (2010). Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite loci for *Gmelina arborea*.

- Mesen, F. (2001). Introducción al mejoramiento genético forestal. Curso nacional sobre identificación, selección y manejo de rodales semilleros, 29.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca. Agricultores de Santo Domingo reciben incentivos forestales.
<http://www.agricultura.gob.ec/?s=melina>: [Recuperado el 17/05/2016]
- Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial Colombia. Cadenas Forestales en Colombia:
http://maderas.ut.edu.co/especies/pagina_especie.php?especie=MELINA:
[Recuperado el 26/12/2016]
- Montes de Oca, T. (2014). Ejercicios resueltos de genética de poblaciones. España.
- Moreira, P. O. (2011). Leaf age affects the quality of DNA extracted from *Dimorphandra mollis* (Fabaceae), a tropical tree species from the Cerrado region of Brazil. *Genetics Molecular*, 353-358.
- Morillo, A. G. (2015). Caracterización molecular con microsatélites amplificados al azar (RAMs) de Inchi (*Caryodendron orinocense* K.). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 46 -53.
- Naik, D., Singh, D., Vartak, V., Paranjpe, S., & Bhargava, S. (2009). Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Roxb. *New Forests*, 99-115.
- Nakagawa, A. S.-N. (2010). Caspase-Dependent Conversion of Dicer Ribonuclease into a Death-Promoting Deoxyribonuclease Science. 327-334.
- Nei, M. L. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceeding of the natural Academy of Science*, 76. 5269-5273.
- Nuñez, E. (2012). Calculadora Geodésica de Transformación entre Coordenadas UTM y Geográficas. Madrid.

- Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura.
Perspectivas mundiales del suministro futuro de madera procedente de
plantaciones forestales.
<http://www.fao.org/docrep/004/X8423S/X8423S00.htm#TOC>: [Recuperado
el 12/01/2017]
- Peakall, R., & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: genetic analysis in Excel.
Population genetic software forteaching and research-anupdate.
Bioinformatics, 19-28.
- Peña, A. B. (2010). Análisis de conglomerados en la identificación de estructura
genética a partir de datos de marcadores moleculares. Tumbaga, 225-237.
- Pérez, M. Z. (2010). Caracterización molecular en el género *Mecardonia* Ruiz & Pav.
(Plantaginaceae) utilizando marcadores ISSR. Revista de la Facultad de
Agronomía, La Plata, 23 -30.
- Piñero, D. (2008). La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y
sus aplicaciones y perspectivas en México. Capital natural de México, 415 -
435.
- Pla, L. (2006). Biodiversidad: Inferencia basada en el Índice de *Shannon* y la riqueza.
583 - 590.
- Ramírez, F. (1997). Resultados de 10 años de investigación silvicultural del proyecto
Madeleña en Costa Rica. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de
Investigación y Enseñanza.
- Rentaría, M. (2007). Breve revisión de los marcadores moleculares. Ecología
Molecular.
- Rigotti, S., Gindro, K., Richter, H., & Viret, O. (2002). Characterization of molecular
markers for specific and sensitive detection of *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. in
strawberry (*Fragaria X ananassa* Duch.) using PCR. Swiss Federal Research
Station for Plant Production of Changing, 169-174.

- Rohlf, J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department Of Ecology and Evolution State University of New York. United States of America.
- Rojas, F. M. (2004). Capítulo 1 Botánica y Ecología Manual para productores de melina en Costa Rica. Cartago.
- Roque, R. M. (2004). Industrialización y usos. Manual para productores de melina *Gmelina arborea* en Costa Rica, 5: 227-229 .
- Roxburgh, W. (1814). Hortus Bengalensis.
- Rueda, A. (2015). Estudio de la diversidad genética de poblaciones de Guayacán Sabanero (*Tabebuia billbergii*) de bosques secos del Ecuador. Sangolquí.
- Sambrook, J. R. (2001). Molecular cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sánchez, I. Z. (2005). Un nuevo modelo para la identificación de la diversidad genética de cacao en Colombia. Palimira Valle del Cauca.
- Sena, J. C. (2012). Chemical and molecular characterization of fifteen species from the Lantana (Veberaceae) genus. Biochemical Systematics and Ecology, 130 - 137.
- Souza, H., Muller, L., Brandão, R., & Lovato, M. (2012). Isolation of high quality and polysaccharide-free DNA from leaves of *Dimorphandra mollis* (Leguminosae), a tree from the Brazilian Cerrado. Genetics and Molecular Research Genet. Mol. Res, 756-764.
- Tel-Zur, N. A. (1999). Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). Plant Molecular Biological, 249-254.

- Thermo Fisher Scientific. (2016). 1 Kb Plus DNA Ladder. <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/10787018>: [Recuperado el 11/08/2016]
- Vallejos, O. (1996). Productividad y relaciones de índice de sitio con variables fisiográficas, edáficas y foliares para *Tectona grandis*, *Bombacopsis quinatum* y *Gmelina arborea*. Turrialba: Catie.
- Villareal, H. Á. (2004). Métodos para el análisis de datos: una aplicación para resultados provenientes de caracterizaciones de biodiversidad. Manula de métodos para el desarrollo de inventarios de biodiversidad. Instituto de investigación de recursos biológicos Alexander Von Humbolt, 188-225.
- Vinueza, M. Ecuador Forestal. Ficha Técnica n.- 3: Melina: <http://ecuadorforestal.org/fichas-tecnicas-de-especies-forestales/ficha-tecnica-no-3-melina/>: [Recuperado el 08/05/2016]
- Wee, A. L. (2011). Genetic diversity in natural populations of *Gmelina arborea*: implications for breeding and conservation. *New Forest*, 411-428.
- Wilches, A. V. (2004). Descripción de algunas herramientas moleculares y sus aplicaciones. 25.
- Yeh, F. B. (1997). Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany*, 129 - 157.
- Zavala, J. (2005). Manual de técnicas básicas de biología molecular. México: Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán.
- Zeaser, D. (1999). Growth Dynamics of the *Gmelina arborea* Plantations of Ston Forestal, Southwest Pacific Costa Rica. *International Symposium on Long-Term Observations and Research in Forestry*, 273-280.