



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE
LA VIDA Y LA AGRICULTURA**

**CARRERA DE INGENIERÍA EN
BIOTECNOLOGÍA**

TRABAJO DE TITULACIÓN

**TEMA: “CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Tectona grandis*
L.f. DE LA COLECCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, MEDIANTE EL USO
DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES
(SSR).”**

AUTORA: TAMAYO HERRERA CARLA ESTEFANIA

DIRECTORA: SEGOVIA SALCEDO MARIA CLAUDIA, Ph.D

SANGOLQUÍ, MARZO DEL 2017



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

CERTIFICACIÓN

Certifico que el trabajo de titulación, “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Tectona grandis* L.f. DE LA COLECCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSR)**”, realizado por **CARLA ESTEFANIA TAMAYO HERRERA**, ha sido revisado en su totalidad y analizado por el software anti-plagio, el mismo cumple con los requisitos teórico, científicos, técnicos, metodológicos y legales establecidos por la Universidad de las Fuerzas Armadas-ESPE, por lo tanto me permito acreditarlo y autorizar al señorita **CARLA ESTEFANIA TAMAYO HERRERA** para que lo sustente públicamente.

Sangolquí, marzo del 2017

CLAUDIA SEGOVIA

DIRECTORA



ESPE
UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

**DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA**

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORÍA DE RESPONSABILIDAD

Yo, **CARLA ESTEFANIA TAMAYO HERRERA**, con cedula de identidad N° 171253148-0 declaro que este trabajo de titulación “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Tectona grandis* L.f., DE LA COLECCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSR)**”, ha sido desarrollado considerando los métodos de investigación existente, así como también se ha respetado los derechos intelectuales de terceros considerándose en las citas bibliográfica.

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, marzo del 2017

CARLA ESTEFANIA TAMAYO HERRERA

C.C 171253148-0



ESPE

UNIVERSIDAD DE LAS FUERZAS ARMADAS
INNOVACIÓN PARA LA EXCELENCIA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA Y LA
AGRICULTURA

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

AUTORIZACIÓN

Yo, **CARLA ESTEFANÍA TAMAYO HERRERA**, autorizo a la Universidad de las Fuerzas Armadas ESPE publicar en la biblioteca Virtual de la institución el presente trabajo de titulación, “**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE *Tectona grandis* L.f. DE LA COLECCIÓN DEL INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS, MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSR)**”, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi autoría y responsabilidad. .

Sangolquí, marzo del 2017

CARLA ESTEFANÍA TAMAYO HERRERA

C.C 171253148-0

DEDICATORIA

“Ser más, para servir mejor”

San Ignacio de Loyola

Sin dudarlo, este trabajo es dedicado a mis padres, que con su apoyo incondicional, nunca dejaron que me rinda, me enseñaron que con esfuerzo y perseverancia se logra cada objetivo planteado.

Carla Estefanía Tamayo Herrera

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a Dios, por bendecirme con mis padres, son el pilar fundamental de mi vida, gracias por todo su esfuerzo, apoyo incondicional y sobre todo por inculcarme valores tan importantes como: la honestidad, respeto y solidaridad. Mami y Papi los Amo mucho, son mi orgullo y mi ejemplo a seguir.

A mi directora del Proyecto de Titulación Claudia Segovia, por su orientación, seguimiento y supervisión, que ha sido fundamental para la conclusión de este proyecto.

Gracias al Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, al Departamento Nacional de Biotecnología, A la Bióloga Katherine Orbe, por sus sugerencias, apoyo, confianza, a la Ingeniera Johana Buitrón, por compartirme sus conocimientos, por su ayuda, paciencia y su linda amistad, al Ingeniero Limongi por su ayuda con la información de las procedencias de Teca y a todos mis compañeros de INIAP (Doña Geito, Santi, Jeff, Doña Paty) por su amistad y apoyo.

Gracias Carlitos, por tu apoyo, por tu amor, por ser la persona que siempre me saca una sonrisa, te amo mucho.

A la Universidad por brindarme todos los conocimientos y por permitirme conocer a personas maravillosas, con las cuales hemos luchado por conseguir nuestros objetivos, gracias amig@s: Ambar, Kathy, Nicky, Liz, Silvi, Julio, Juan, Diego, Santi, Chris, los quiero mucho, y sin ustedes la vida en la Universidad hubiera sido muy difícil.

ÍNDICE DE CONTENIDO

| | |
|---|-----------|
| DEDICATORIA..... | v |
| AGRADECIMIENTOS..... | vi |
| LISTADO DE FIGURAS..... | x |
| LISTADO DE ANEXOS | xiii |
| RESUMEN | xiv |
| ABSTRACT | xv |
| 1 CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN..... | 1 |
| 1.1 Formulación del Problema..... | 1 |
| 1.2 Justificación | 3 |
| 1.3 Objetivos..... | 4 |
| 1.3.1 Objetivo General | 4 |
| 1.3.2 Objetivos Específicos | 4 |
| 1.4 Marco Teórico | 4 |
| 1.4.1 Teca (<i>Tectona grandis</i> L.f)..... | 4 |
| 1.4.2 Diversidad Genética | 7 |
| 1.4.3 Caracterización molecular de <i>Tectona grandis</i> L.f | 7 |
| 1.5 Hipótesis | 11 |
| 2 CAPÍTULO II- MATERIALES Y MÉTODOS | 12 |
| 2.1 Participantes..... | 12 |
| 2.1.1 Institución | 12 |
| 2.1.2 Responsable del proyecto..... | 12 |
| 2.1.3 Colaboradores científicos | 12 |
| 2.2 Recolección del Material Vegetal..... | 13 |
| 2.3 Extracción de material genético de <i>T. grandis</i> | 14 |

| | | |
|-------|--|----|
| 2.4 | Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría..... | 15 |
| 2.5 | Validación del ADN de <i>T. grandis</i> | 15 |
| 2.6 | Validación de <i>Primers</i> Microsatélites..... | 16 |
| 2.7 | Amplificación utilizando metodología M13 <i>Tailing</i> | 17 |
| 2.8 | Corrida electroforética de productos PCR y Genotipaje en el LI-COR 4300S 18 | |
| 2.9 | Análisis de Datos | 19 |
| 2.9.1 | Diversidad Genética | 19 |
| 2.9.2 | Estructura genética | 21 |
| 3 | CAPÍTULO III- RESULTADOS..... | 24 |
| 3.1 | Caracterización Genética | 24 |
| 3.1.1 | Recolección del Material Vegetal | 24 |
| 3.1.2 | Extracción y Cuantificación de ADN..... | 25 |
| 3.1.3 | Validación de ADN | 25 |
| 3.1.4 | Validación de <i>Primers</i> | 26 |
| 3.1.5 | Amplificación, Corrida electroforética y Genotipaje en el LI-COR 4300S 28 | |
| 3.2 | Análisis de Datos | 29 |
| 3.2.1 | Diversidad Genética | 29 |
| 3.2.2 | Estructura Genética | 39 |
| 3.2.3 | Estadística F..... | 44 |
| 3.2.4 | Análisis de AMOVA | 45 |
| 3.2.5 | Identificación de genotipos duplicados | 46 |
| 4 | CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN | 47 |
| 4.1 | Recolección del Material Vegetal..... | 47 |
| 4.2 | Extracción, cuantificación y validación de ADN | 47 |
| 4.3 | Validación de cebadores (<i>primers</i>) | 48 |

| | | |
|-----|------------------------------------|----|
| 4.4 | Diversidad Genética..... | 48 |
| 4.5 | Estructura Genética..... | 49 |
| 4.6 | Estadística F..... | 50 |
| 4.7 | Análisis de AMOVA | 51 |
| 4.8 | Identificación de Duplicados | 51 |
| 5 | CAPITULO V: CONCLUSIONES..... | 53 |
| 6 | CAPITULO VI: RECOMENDACIONES | 55 |
| 7 | CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA | 56 |

LISTADO DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Plantación de árboles de <i>Tectona grandis</i> pertenecientes a Asoteca | 5 |
| Figura 2 Flores y Frutos de <i>Tectona grandis</i> , obtenida en: Unicentro, manejo Forestal | 7 |
| Figura 3 Amplificación de marcadores microsatélites, Obtenida en: Biotecnología.2012..... | 9 |
| Figura 4. Descripción del proceso de PCR en los 3 ciclos de reacción, Obtenida en: Espinosa, 2004, Guía práctica sobre la técnica de PCR | 11 |
| Figura 5. Recolección de Material vegetal de Teca de la colección del INIAP Estación Experimental Tropical Pichilingue | 25 |
| Figura 6. Validación ADNs de Teca utilizando el <i>primer</i> DA12, en gel de agarosa 2% (p/v) (Pocillo M: marcador de peso molecular 1kb plus de Invitrogen, en el pocillo 1 y 2 se encuentran los positivos y en los demás pocillos muestras de la 41 hasta la 65)..... | 26 |
| Figura 7. Validación de Primers microsatélites en gel de agarosa 2% (p/v) con 8 muestras de ADN genómico de <i>T. grandis</i> , utilizando el marcador de peso molecular 1kb plus de in vitro gen | 27 |
| Figura 8. Validación de Primer H09 en gel de agarosa 2% (p/v), utilizando gradientes de temperatura de anneiling, con 7 muestras de ADN genómico de <i>T. grandis</i> (Pocillo M: marcador de peso molecular 1kb plus de in vitro gen)..... | 27 |
| Figura 9. Dendrograma obtenido estimando la similitud (SM) con el algoritmo Ward para el análisis de agrupamiento de 90 accesiones provenientes del INIAP | 40 |
| Figura 10. Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM del análisis simultaneo de las accesiones <i>Tectona grandis</i> , de la colección del INIAP | 41 |
| Figura 11. Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM del análisis simultaneo de las procedencias <i>T. grandis</i> , de la colección del INIAP | 43 |
| Figura 12. Porcentaje del análisis molecular de varianza de 2 grupos de poblaciones | |

| | |
|----------------------------|----|
| de <i>T. grandis</i> | 45 |
|----------------------------|----|

LISTADO DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Clasificación taxonómica de Teca, Fuente: Proaño, 2007 | 5 |
| Tabla 2. Condiciones Geográficas de EELS y EETP | 13 |
| Tabla 3 Coctel de amplificación para la validación de muestras empleando un marcador microsatélite (CIRADITeakDA12). Fuente: Morillo y Miño, 2011. | 15 |
| Tabla 4 Programa de amplificación para la validación de las muestras de <i>T. grandis</i> con el marcador CIRAD1TeakDA12. Fuente: Morillo y Miño, 2011. | 16 |
| Tabla 5 Marcadores microsatélites reportados en la investigación de Verhaegen et al., (2005), y la identificación de estos, para la amplificación de la población en estudio. | 16 |
| Tabla 6 Coctel de amplificación, metodología M13tailing. Fuente: Morillo y Miño, 2011. | 17 |
| Tabla 7 Programa de amplificación, metodología M13 tailing. Fuente: Morillo y Miño, 2011..... | 18 |
| Tabla 8 Marcadores microsatélites para Teca, amplificados con temperatura de annealing reportada..... | 26 |
| Tabla 9 Geles de poliacrilamida, genotipados con el programa SAGAGT, utilizando ADN genómico de <i>T. grandis</i> | 28 |
| Tabla 10 Resumen de la Diversidad genética presente en <i>T. grandis</i> de la colección del INIAP..... | 30 |
| Tabla 11 Resumen de la Diversidad genética presente en <i>T. grandis</i> de las accesiones provenientes de la EETP..... | 31 |
| Tabla 12 Locus SSR con sus alelos registrados y frecuencia alélica en el estudio de variabilidad genética en <i>T. grandis</i> L. proveniente de EETP. En verde se muestran los alelos más frecuentes y en azul los alelos menos frecuentes. | 31 |
| Tabla 13 Resumen de la Diversidad genética presente en <i>T. grandis</i> de las accesiones provenientes de la EELS..... | 35 |

| | |
|--|----|
| Tabla 14 Marcadores SSR con sus alelos registrados y frecuencia alélica en el estudio de variabilidad genética en <i>Tectona grandis</i> L. proveniente de EELS. En verde se muestra el alelo más frecuentes y en azul los alelos menos frecuentes..... | 35 |
| Tabla 15 Endogamia total, Índice de fijación de accesiones de <i>Tectona grandis</i> , de la colección del INIAP. | 44 |
| Tabla 16 Análisis molecular de varianza de 2 grupos de poblaciones de <i>T. grandis</i> utilizando 14 primers SSR..... | 45 |
| Tabla 17 Identificación de duplicados de <i>T. grandis</i> de la colección del INIAP | 46 |

LISTADO DE ANEXOS

- ANEXO 1.** Colección de *Tectona grandis L.*, pertenecientes al INIAP
- ANEXO 2.** Ubicación geográfica de la colección de Teca del INIAP
- ANEXO 3.** Cuantificación de ADN de *Tectona grandis L.*, de la colección del INIAP
.....
- ANEXO 4.** Matriz genotípica de *Tectona grandis L.*, de la colección del INIAP.....
- ANEXO 5.** Análisis de coordenadas principales de las procedencias de Teca de la
colección del INIAP

RESUMEN

En los últimos años, la producción de la Teca (*Tectona grandis* L.f), ha incrementado su potencial económico en el Ecuador por la calidad de su madera. Dentro de este contexto, la Subsecretaría de Producción Forestal del MAGAP, la ha considerado como una especie priorizada con fines comerciales. Reflejando esta prioridad nacional, el presente trabajo tuvo como objetivo generar información molecular que permita analizar de diversidad genética de esta especie y sus resultados servirán como base para generar un mejoramiento genético forestal orientado principalmente a la obtención de características en la madera, con el fin de aumentar la productividad y competitividad. Se analizaron 90 accesiones de la colección del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, de las cuales 79 pertenecen a la Estación Experimental Litoral Sur (EELS) y las 11 restantes pertenecen a la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP). Se obtuvieron los perfiles alélicos con 14 cebadores SSR polimórficos, en los cuales se detectaron 127 alelos en un rango de longitud de 113 pb a 281 pb, con un promedio de 9 alelos/locus. El análisis de conglomerados y el de coordenadas principales permiten observar la formación de dos grupos claramente establecidos que concuerdan con la distribución geográfica. La Estadística F y AMOVA indican que los marcadores moleculares SSR mostraron una ligera diferenciación entre los grupos poblacionales estudiados y gran variabilidad detectada dentro de los mismos.

Palabras Clave:

MARCADOR

MOLECULAR

DIVERSIDAD GÉNÉTICA

TECA

SSR

ABSTRACT

In the last years, Teak's production has increased due to the wood quality in Ecuador, generating a good economic business. In this context, the Government Institution MAGAP has prioritize this species with an economic value. As a result, this study had the goal to generate molecular data of Teak for genetic diversity analyses. The results can be used as a basis information for genetic improvement oriented to wood features and increase of productivity and competitively in Ecuador. Ninety accessions were collected from the Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias collections. Seventy nine belong to the Estacion Experimental Litoral Sur (EELS) and the remaining 11 to the Estacion Experimental Tropical Pichilingue (EETP). Allele profiles were obtained with 14 polymorphic SSR primers, 127 alleles were detected from 113 bp to 281 bp, with an average of 9 alleles / locus. The cluster and PCA analyses generated two clearly groups that are consistent with the geographical distribution. Statistical F and AMOVA indicate that the molecular markers SSR showed a slight differentiation between the population groups and great variability detected within them.

Keywords:

MARKERS

MOLECULAR

GENETIC DIVERSITY

TEAK

SSR

1 CAPÍTULO I- INTRODUCCIÓN

1.1 Formulación del Problema

La especie forestal Teca (*Tectona grandis* L.f.), es originaria del sudeste asiático, pertenece a la familia Verbenaceae, alcanza hasta los 50 m de altura. *T. grandis* es cotizada como una de las maderas tropicales más valiosas y mejor conocidas, extensamente plantada para la producción de madera, empleada en la ebanistería y construcción naviera (Flores *et al.*, 2010). La dureza de la madera es una cualidad muy apreciada para diversos usos, debido a su contenido de sílice; fácil de trabajar, secar y preservar, es resistente a termitas y algunos insectos debido a que tiene un aceite antiséptico que la protege del ataque de diversos organismos (Ecobosques, 2015).

El sector maderero en el país está creciendo, especialmente en la exportación de *T. grandis*. En el 2013 el Gobierno Nacional ha creado, a través de la Subsecretaría de Desarrollo Forestal del Ministerio de Agricultura (MAGAP), el Programa de Incentivos para la Reforestación con fines comerciales, en donde *T. grandis* se encuentra dentro de las especies priorizadas (ELAGRO, 2014)

Tectona grandis es una especie diploide $2n = 36$ (Gill *et al.*, 1983), su propagación se realiza por vía sexual, utilizando semilla de origen desconocido. Habitualmente, las plantas de las cuales se obtienen las semillas no son seleccionadas por las características fenotípicas ni por el origen, lo que genera una elevada variabilidad genética y fenotípica en las plantaciones establecidas posteriormente (Nieto *et al.*, 2013).

La primera plantación de *T. grandis* del Ecuador fue establecida en el año 1950, dentro de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) , cantón Quevedo, provincia de los Ríos, con semillas provenientes de la India, a partir de la cual se expandieron nuevas plantaciones (Nieto *et al.*, 2013). En el país se ha analizado la diversidad genética del germoplasma de *T. grandis* con marcadores RAPDs y AFLPs, donde se evidenció la

variabilidad de la especie como producto de la constante polinización libre y natural; así como, la introducción de nuevas fuentes génicas (Nieto *et al.*, 2013).

Estudios de diversidad a nivel genético en *T. grandis*, realizados en Costa Rica reportan que el uso de marcadores moleculares AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y microsatélites, determinaron un claro agrupamiento de familias, lo cual sugiere un alto parentesco de la población (González, 2007; Alcantara y Veasey, 2013). Los marcadores moleculares presentan ventajas al compararlos con marcadores morfológicos; debido a su alto número e independencia de los efectos del medio ambiente. Estos marcadores revelan diferencias existentes entre los genomas como producto del proceso evolutivo y la caracterización de germoplasma (Wilches, 2004). Entre los diferentes tipos de marcadores de ADN, los microsatélites son los más ideales debido a su naturaleza multialélica y codominancia, lo que permite distinguir entre homocigotos y heterocigotos (Ellegren, 2004); también poseen un alto contenido de polimorfismos, por lo tanto son regiones adecuadas para usarse como marcadores moleculares en el nivel poblacional (Zane *et al.*, 2002). El empleo de los marcadores moleculares microsatélites durante la caracterización genética o “genetic finger printing”, permiten obtener mayor información en cuanto a variabilidad genética (Gupta y Varshney, 2000); así como, realizar mapeo genético que permite ubicar genes con interés comercial como: resistencia a plagas o responsables de crecimiento, y para estudios de estructura genética de poblaciones (Jehle *et al.*, 2002).

En el Ecuador no se han reportado estudios de diversidad genética con marcadores moleculares microsatélites, en la investigación realizada por Nieto *et al.*, (2013) diversidad genética del germoplasma de *T. grandis* con marcadores RAPDs y AFLPs, se recomienda complementar el trabajo con otras técnicas como los microsatélites que ofrecen como ventajas la definición de parentescos y de las estructuras genéticas de las poblaciones de interés. Por lo tanto, en este estudio se caracterizará molecularmente a la colección de *T. grandis* del INIAP utilizando marcadores moleculares microsatélites para analizar la diversidad genética de la planta, para realizar trabajos posteriores de mejoramiento genético del material vegetal para incrementar la producción y competitividad.

1.2 Justificación

Tectona grandis es considerada una especie de gran valor comercial, por la calidad de su madera. En el Ecuador, esta especie fue introducida en 1950 y ha adquirido gran importancia económica, por su rápido crecimiento por la aportación de biomasa al suelo. La exportación reportada en el 2014 por Asoteca fue de 283.000 toneladas generando 50 millones de dólares aproximadamente.

La Subsecretaría de Producción Forestal del MAGAP creó un programa de incentivos para la reforestación con fines comerciales en donde *T. grandis* es una de las especies priorizadas, los objetivos de este programa son: generar materia prima para el abastecimiento de la industria maderera, reducir la dependencia de importación de productos forestales e incentivar el desarrollo industrial del sector forestal incorporando a las comunidades campesinas en el establecimiento y manejo de plantaciones forestales. Con el fin de incentivar programas de mejoramiento genético forestal, que ofrezcan en el mediano plazo, material vegetal mejorado que aumente la productividad y competitividad.

Actualmente, el Programa Nacional de Forestería se encuentra realizando estudios de caracterización morfológica y evaluación de adaptabilidad de la teca en la Estación Experimental Litoral Sur (EELS), como parte del estudio colaborativo solicitaron al Departamento Nacional de Biotecnología que participe en la caracterización molecular de la población en evaluación, para determinar la diversidad genética de la colección de *T. grandis* del INIAP, con estos trabajos se establecerán bases para el mejoramiento genético forestal orientada principalmente a la obtención de características enfocadas en la madera. La información morfológica y la molecular permitirán identificar a los árboles elite para la propagación masiva utilizando cultivo *in vitro*, con el propósito de aumentar la producción de la especie, aplicando técnicas de biología molecular como marcadores moleculares que permitan el estudio de la diversidad de la colección de plantas a nivel genómico, ya que los microsatélites son

un tipo de marcador de ADN que ha adquirido preponderancia en la definición de genotipos individuales y en los estudios del flujo de genes de árboles forestales.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Caracterizar molecularmente *Tectona grandis*, de la colección del INIAP, mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites (SSR).

1.3.2 Objetivos Específicos

- Determinar la diversidad genética de la colección establecida en el INIAP de *T. grandis* con marcadores moleculares microsatélites (SSR)
- Determinar frecuencias alélicas presentes en las muestras de *T. grandis* con marcadores moleculares SSR.
- Identificar duplicados y grupos representativos de diversidad en la colección de *T. grandis* del INIAP

1.4 Marco Teórico

1.4.1 Teca (*Tectona grandis* L.f)

La Teca es una especie latifoliada perteneciente a la familia Verbenaceae. Es un árbol grande, que puede alcanzar los 50 m de altura y 2 m de diámetro en su lugar de origen. Posee tallo recto, corteza áspera de color café (Fonseca, 2004); en la Figura 1 se observan plantaciones de *T. grandis* obtenida de Asoteca. Briscoe (1995) y Lamprecht (1990); mencionan que *T. grandis* en condiciones naturales crece en diversos tipos de suelo pero el mejor desarrollo se da en suelos franco-arenosos a arcillosos, con pH ligeramente ácidos a neutros, fértiles, con buen drenaje y profundos.



Figura 1. Plantación de árboles de *Tectona grandis* pertenecientes a Asoteca

La madera de estos árboles es fácil de manejar, valiosa, con gran prestigio y valor. Además de su apariencia, el color amarillo bronceado a café oscuro es su distintivo, junto con las líneas claras y oscuras acentuadas, hacen que la madera sea más vistosa en cortes transversales. Tiene propiedades únicas de estabilidad, haciéndola ideal para aplicaciones exteriores, el costo elevado limita la utilización de esta madera en trabajos de decoración interior (Rivero, 2004).

1.4.1.1 Taxonomía de *Tectona grandis* L.f

En la Tabla 1 se detalla la clasificación taxonómica en el reino vegetal de la Teca.

Tabla 1

Clasificación taxonómica de Teca, Fuente: Proaño, 2007

| | |
|-----------|----------------------------|
| Reino: | <i>Plantae</i> |
| División: | <i>Angiospermae</i> |
| Clase: | <i>Dicotyledoneae</i> |
| Orden: | <i>Tubiflorae</i> |
| Familia: | <i>Verbenaceae</i> |
| Género: | <i>Tectona</i> |
| Especie: | <i>Tectona grandis</i> L.f |

1.4.1.2 Clima

Tectona grandis puede crecer en una gran variedad de climas (Streets, 1962) pero se desarrolla mejor en condiciones tropicales moderadamente húmedas y calientes (Kadambi, 1972). Gran parte del área donde se encuentra naturalmente *T. grandis* se caracteriza por climas de tipo monzonal, los cuales tienen una precipitación de entre 1300 y 2500 mm por año y una estación seca de 3 a 5 meses (Salazar, 1974).

T. grandis es natural de áreas secas, incluso en condiciones de sequía y calientes, sin embargo, en la India cuando las condiciones de sequía son prolongadas han provocado la muerte tanto árboles y en brotes de los troncos cortados (Ryan, 1982). Las fluctuaciones de temperatura que tolera *T. grandis* varían entre 2 y 48 °C (Troup, 1999).

1.4.1.3 Flores y Fruto

Las flores presentan ambos sexos en la misma planta (monoicas), su distribución se da por panículas rectas y ramificadas (Little, 1974), se encuentran cubiertas por vellos finos, poseen un cáliz acampanado de color gris con seis lóbulos. La corola tiene forma de embudo y color blanquecino, con un tubo corto y seis lóbulos extendidos. En la América Central y en Sudamérica, el brote de flores se da por lo general entre junio y septiembre, y las frutas maduran de febrero a abril (Chable, 1997 y Chaves 1991). *T. grandis* es principalmente una especie de polinización cruzada, tienen alta incompatibilidad con sí misma (Bryndum, 1969). Las frutas resultantes de la autopolinización pueden ocurrir, pero la germinación es baja en comparación con las frutas que resultan de polinización cruzada. Dos especies de abejas de miel (Apidae: *Heriades parvula* y *Ceratina hieroglyphica*) han sido identificadas como las principales polinizadoras. La fruta, una drupa de color pardo claro y alrededor posee vellos finos (Chable, 1997). En la Figura 2; se observan las flores y frutos de la Teca.



Figura 2 Flores y Frutos de *Tectona grandis*, obtenida en: Unicentro, manejo Forestal

1.4.2 Diversidad Genética

La diversidad genética es la variación de genes dentro de cada especie. En donde pueden incluirse a poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población. La pérdida de individuos, poblaciones y especies disminuye la variabilidad de genes con lo que se dificulta su adaptación a cambios (Moreno, 2011).

La variabilidad genética ha ido avanzado progresivamente desde estudios de polimorfismo cromosómico, los análisis fisiológicos, los estudios bioquímicos isoenzimáticos, hasta el análisis a escala molecular que incluye el secuenciamiento del ADN, en donde se logra detectar la variación a nivel nucleotídico (Nuez *et al.*, 2000).

La caracterización de la diversidad genética es un aspecto importante en la conservación y mejora de las especies forestales, ya que permite identificar y distinguir genotipos diferentes, es conveniente al inicio las actividades de selección, realizar una verificación de la identidad de los individuos que son parte de la población de mejora (Cheliak, 1993).

1.4.3 Caracterización molecular de *Tectona grandis* L.f

1.4.3.1 Marcadores moleculares

Históricamente se han usado herramientas moleculares para la caracterización e identificación de variedades (Rallo *et al.*, 2002). Existen dos clases de marcadores

genéticos: los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares. Con los marcadores morfológicos se puede evaluar la taxonomía o clasificación de organismos mediante el análisis fenotípico, estos marcadores son limitados ya que las características a medir no son infinitas, porque es necesario que se midan en cierta etapa del crecimiento y el medio ambiente puede influenciar (Tanksley, 1983). Por otro lado, el desarrollo de los marcadores moleculares ha ayudado a eliminar los inconvenientes de una selección basada en el análisis exclusivo del fenotipo, como la identificación de especies y variedades de una forma más rigurosa y repetitiva (ArgenBio, 2007).

Los marcadores moleculares sirven para detectar la transmisión de un segmento de cromosoma de una generación a otra (Tanksley, 1983), son muy útiles en muchos campos de la biología como evolución, biomedicina, estudios de diversidad, ciencias forenses, y estudios en ecología, además sirven para localizar y aislar genes de interés.

En la actualidad existen varias técnicas moleculares que permiten conocer cómo se encuentran las proporciones de genes en las poblaciones naturales de manera indirecta, como con los análisis de proteínas, o de manera directa con estudios de ADN. Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominante (Simpson, 1997).

Una de las ventajas de trabajar con marcadores moleculares es que se enfocan directamente con la variación genética, los caracteres se pueden seleccionar y definir de una manera relativamente objetiva (Hillis y Wiens, 2000).

1.4.3.2 Microsatélites

Los microsatélites son marcadores que presentan herencia mendeliana simple, codominante es decir que se puede diferenciar los individuos homocigotos y heterocigotos, estos marcadores consisten en secuencias cortas (de 1 a 6 bases nucleotídicas) se encuentran repetidas en tándem varias veces (Figura 3), el número de copias entre individuos se realiza con la técnica de PCR, son fácilmente automatizables y además permite utilizar muestras no invasivas (Provan *et al.*, 2001). Debido a la elevada tasa de polimorfismos que presentan estos marcadores

componentes para realizar la PCR son: molde de ADN a partir de este se busca obtener la copia de un fragmento, dos *primers* específicos complementarios a una porción de la región que se desea amplificar, ADN polimerasa enzima capaz de sintetizar ADN, los deoxinucleótidos (dNTPs) los cuales se incorporaran a las cadenas de ADN naciotes, el ión magnesio (Mg^{+}), una solución amortiguadora o buffer y agua (Greif, 2005).

Todos estos elementos necesarios para realizar una PCR van a interactuar en tres etapas principales de las que se compone la reacción: desnaturalización, hibridación y extensión, son explicadas a continuación (Figura 4)

Desnaturalización. En esta fase, las cadenas de ADN se calientan y se separan a una temperatura de 95 °C durante 20-30 segundos; el tiempo dependerá de la secuencia, es decir, si existe alta cantidad de Guanina-Citocina, se necesitará más tiempo para romper sus uniones ya que el apareamiento de estas bases está formado por tres enlaces de hidrógeno, uno más que las bases de Adenina-Timina. También va a depender de la velocidad en la que el termociclador incrementa la temperatura, la cual varía según el modelo del equipo. Al final de esta etapa tendremos las cadenas separadas que se utilizarán en la hibridación (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Hibridación. En esta fase la temperatura disminuye para permitir que los cebadores se unan por complementariedad al DNA molde, las temperaturas habituales se encuentran entre 35 y 60°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

Extensión. Es el siguiente paso en donde la enzima polimerasa incorpora nucleótidos complementarios a partir del extremo 3' libre de la región en que han hibridado los cebadores. La temperatura en esta fase depende de la enzima polimerasa empleada; cuando se utiliza Taq polimerasa la temperatura de elongación por lo general es de 72°C (Tamay de Dios *et al.*, 2013).

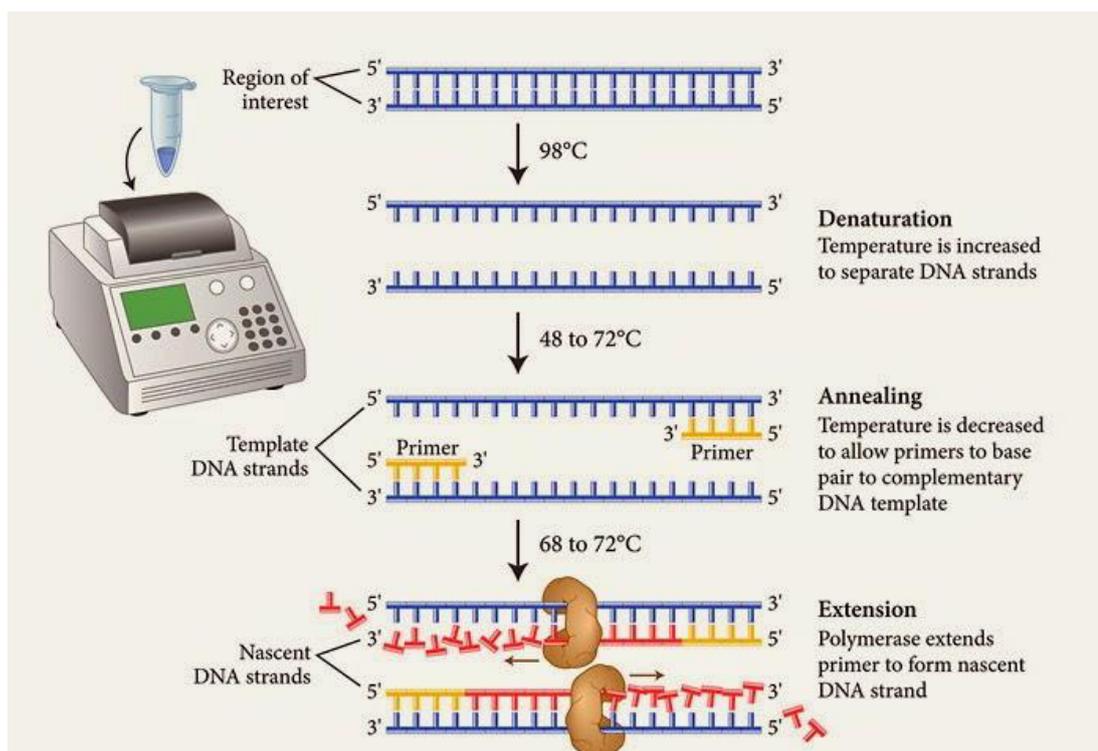


Figura 4. Descripción del proceso de PCR en los 3 ciclos de reacción, Obtenida en: Espinosa, 2004, Guía práctica sobre la técnica de PCR

Los equipos en donde se lleva a cabo la PCR son los termocicladores, están diseñados como un sistema homogéneo en donde no haya modificación de las temperaturas y los tiempos necesarios en cada uno de los ciclos. Para visualizar los productos obtenidos de una PCR (amplicones), se los analiza en geles de agarosa para confirmar si la reacción fue exitosa (Tamay de Dios *et al.*, 2013). El resultado de la reacción son millones de copias del fragmento de ADN comprendido entre los *primers* específicos (Greif, 2005).

1.5 Hipótesis

Ho. No existe variabilidad genética en la colección de *Tectona grandis* del INIAP.

2 CAPÍTULO II- MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Participantes

2.1.1 Institución

La institución auspiciante de esta investigación es el INIAP

2.1.2 Responsable del proyecto

Carla Estefanía Tamayo Herrera

2.1.3 Colaboradores científicos

Lic. Katherine Orbe

Responsable del Departamento
Nacional de Biotecnología de la Estación
Experimental Santa Catalina.

Ing. Johanna Buitrón

Técnica del área de Biología Molecular
del Departamento Nacional de
Biotecnología

Claudia Segovia, Ph.D

Directora de tesis

2.2 Recolección del Material Vegetal

Se colectaron 90 accesiones de *T. grandis* de la colección del INIAP: 79 accesiones pertenecientes a la colección de la Estación Experimental Litoral Sur (EELS) ubicada en el Km 26 Vía Durán-Tambo, las 11 accesiones restantes, pertenecientes a la colección de la Estación Experimental Tropical Pichilingue (EETP) ubicada en el Km 5 vía Quevedo, en la Tabla 2 se encuentran detalladas las condiciones geográficas de las estaciones nombradas.

Tabla 2.
Condiciones Geográficas de EELS y EETP

| Parámetros | EELS | EETP |
|---------------------------|----------|------------|
| Temperatura promedio | 24,6 ° C | 25.47°C |
| Humedad relativa promedio | 83 % | 85.84 % |
| Precipitación anual | 1.398 mm | 2223.85 mm |

Para la selección de las muestras se utilizaron parámetros, que Limongui junto con otros investigadores del Programa de Forestería plantearon en el año 2015, los cuales se basan en las características fenotípicas de individuos sobresalientes como:

- a) Altura comercial del árbol y presencia de fuerte dominancia apical.
- b) Posición sociológica: dominante o al menos codominante.
- c) Diámetro del tallo a 1.30 m (DAP).
- d) Ausencia de ramas gruesas.
- e) Ausencia de bifurcación.
- f) Ausencia de aletones o gambas basales
- g) Estado fitosanitario, tolerancia o resistencia a las principales enfermedades y probablemente de hongos oportunistas del género *Fusarium spp.*

El protocolo empleado para la recolección de hojas medianamente maduras fue el de Ferreria *et al.*, (1998) utilizado para la toma de muestras vegetales secas.

Se llenaron fundas ziploc con 50-100 g de sílica gel y se eliminó el aire de la funda; posteriormente, se cortaron 20 g de hojas medianamente maduras de cada planta y se colocó inmediatamente en la sílica gel para secarlas y conservarlas, se refrescó la sílica gel después de 48 horas, se verificó que la muestra esté completamente seca y se eliminó la sílica de la funda.

En el anexo.1 se detalla la colección perteneciente al INIAP, y en el anexo 2 se encuentra la ubicación geográfica de la colección, utilizando el software DIVA-GIS 7.5.

2.3 Extracción de material genético de *T. grandis*.

El protocolo utilizado para la extracción de material genético de Teca fue el de Souza *et al.*, (2012), en el cual se añadió a la muestra 1ml de Buffer Sorbitol (Tris-HCl, pH 8.0, sorbitol 0.35M, EDTA 5mM, pH 8.0, almacenado a 4°C y antes de su uso se añadió PVP-40 1% y 2-mercaptoetanol 1%), posteriormente se centrifugó durante 10 min a 5700 rpm, se eliminó el sobrenadante, se repitió el proceso 3 o 4 veces. Luego se añadió 1 ml de Buffer CTAB (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0, NaCl 3 M, CTAB 3%, EDTA 20 mM, pH 8.0, se precalentó a 60°C añadiendo PVP-40 1% y 2-mercaptoetanol 0.2%) y se incubó durante una hora a 60°C. Se adicionó 700 µl de CIA (Cloroformo: Alcohol Isoamílico 24:1 V/V) se mezcló suavemente durante 20 minutos, y se centrifugó durante 10 minutos a 13000 rpm, se repitió el proceso una vez más, Se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo, se añadió Acetato de sodio (3M, pH 5.2) 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 80 µl de solución TE-ARNasa, se incubó por 15 minutos a 37°C.

2.4 Cuantificación de ADN mediante espectrofotometría

Se realizó la cuantificación de ADN genómico de *T. grandis* mediante espectrofotometría en el equipo para microplacas EPOCH™ de Biotek®, empleado el programa GEN5. Se colocó 2 µL de muestra en la microplaca Take 3, a través de las lecturas de absorbancias (260 nm y 280 nm) el programa GEN5 determinó la concentración de la muestra y su índice de pureza. Con los resultados de cuantificación de la muestra, se realizó una dilución del ADN a 5 ng/µL para continuar con la validación de las mismas.

2.5 Validación del ADN de *T. grandis*

Se validaron las muestras mediante una PCR sencilla empleando el marcador CIRAD1TeakDA12. La preparación del coctel PCR y el programa térmico empleado en el termociclador se detallan en las Tablas 3 y 4 (Morillo y Miño, 2011).

Tabla 3

Coctel de amplificación para la validación de muestras empleando un marcador microsatélite (CIRAD1TeakDA12). Fuente: Morillo y Miño, 2011.

| REACTIVOS: | CI* | CF* | VOL. 1 rx (uL) |
|------------------------|-------|------|----------------|
| AGUA UP | - | - | 2,18 |
| BUFFER PCR (X) | 5,00 | 1,00 | 1,50 |
| MgCl ₂ (mM) | 25,00 | 2,00 | 0,60 |
| dNTP's (mM) | 5,00 | 0,25 | 0,38 |
| Primer (uM) F | 10,00 | 0,50 | 0,38 |
| Primer (uM) R | 10,00 | 0,50 | 0,38 |
| Taqpolimerasa (U/uL) | 5,00 | 0,06 | 0,10 |
| MUESTRA (ng/uL) | 5,00 | 1,33 | 2,00 |
| VOL. TOTAL (uL) | | | 7,50 |

*CI: Concentración inicial de los reactivos

*CF: Concentración final de los reactivos

Tabla 4

Programa de amplificación para la validación de las muestras de *T. grandis* con el marcador CIRAD1TeakDA12. Fuente: Morillo y Miño, 2011.

| | °T (°C) | TIEMPO | CICLOS |
|---|---------|--------|-----------|
| 1 | 94 | 5 min | 1 ciclo |
| 2 | 94 | 45 seg | 30 ciclos |
| 3 | 51 | 1 min | |
| 4 | 72 | 2 min | |
| 5 | 72 | 7 min | 1 ciclo |
| 6 | 10 | 5 min | 1 ciclo |

2.6 Validación de *Primers* Microsatélites

Se realizó la validación de la amplificación de los 15 marcadores microsatélites reportados en la investigación de Verhaegen *et al.*, (2005), En la Tabla 5 se observan los marcadores utilizados y la identificación que se les dio a los *primers* en el estudio realizado en el INIAP; se emplearon 8 muestras de ADN validadas para este propósito. La preparación del coctel PCR para la validación y el programa térmico empleado en el termociclador se detallan en las Tablas 3 y 4 (Morillo y Miño, 2011).

Tabla 5

Marcadores microsatélites reportados en la investigación de Verhaegen *et al.*, (2005), y la identificación de estos, para la amplificación de la población en estudio.

| Nombre | Accession no. EMBL Database | Secuencia | Repetición de los motivos | Ta (°C) | Identificación dentro de este estudio |
|---------------|-----------------------------|---|---|---------|---------------------------------------|
| CIRAD1TeakA06 | AJ968929 | F: 5'-CAAAACAAAACCAATAGCCAGAC-3' R: 5' - TTTCATCATCATCAACATCC-3' | (GA) ₁₅ | 51,00 | A06 |
| CIRAD1TeakB03 | AJ968930 | F: 5'- AACAACCCCTCTCTCTTCACTA-3 ' R: 5' CACTACCACTCATCAACACA-3' | (TC) ₅ TG (TC) ₈ (AC) ₅ (N) ₆₅ (AC) ₁₄ | 51,00 | B03 |
| CIRAD1TeakF05 | AJ968931 | F: 5'- CTTCTGCAACCCTTTTTCAC -3' R: 5' - AGCCATATCTTCTTCTCT-3' | (GA) ₂₀ GT (GA) ₃ | 51,00 | F05 |
| CIRAD1TeakG02 | AJ968932 | F: 5'- TTAACGCCAAATCCCAAAG-3 ' R: 5'- CACAAAGAGAACCGACGAG-3 ' | (TC) ₁₀ | 51,00 | G02 |
| CIRAD1TeakH10 | AJ968933 | F: 5'- CGATACCTGCGATGCGAAGC-3' R: 5'- CGTTGAATACCGATGGAGA-3' | (TC) ₁₆ | 51,00 | H10 |
| CIRAD2TeakB07 | AJ968934 | F: 5'- GGGTGCTGATGATTTTGAGTT-3' R: 5 - CTAAGGAGTGAGTGGAGTTT-3 ' | (TC) ₁₄ | 51,00 | B07 |
| CIRAD2TeakC03 | AJ968935 | F: 5'- AGGTGGGATGTGGTTAGAAGC-3' | (GA) ₁₇ | 51,00 | C03 |

| | | | | | |
|----------------|----------|--|---|-------|------|
| | | R: 5'-AAATGGTCATCAGTGTCCAGAA-3' | | | |
| CIRAD3TeakA11 | AJ968936 | F: 5'-AAACCATGACAGAAACGAATC-3' R: 5'-TTGGGAATGGGAGGAGAAGT-3' | (GA) ₁₆ | 51,00 | A11 |
| CIRAD3TeakB02 | AJ968937 | F: 5'-ATGAAGACAAGCCTGGTAGCC-3' R: 5'-GGAAGACTGGGGAATAACACG-3' | (TC) ₁₁ GC(TC) ₄ (N) ₆₂ (AC) ₇ | 51,00 | B02 |
| CIRAD3TeakDa09 | AJ968938 | F: 5'-CTCGCTTCTTCCACATT-3' R: 5'-ATCATCGCGCATCGTCAA-3' | (AC) ₁₀ | 51,00 | Da09 |
| CIRAD3TeakE06 | AJ968939 | F: 5'-GCGTCAACCACTTCAACCACCAG-3' R: 5'-CCTATTTCTTCCCTCCCTTCT-3' | (GA) ₁₀ CA(GA) ₂ | 51,00 | E06 |
| CIRAD3TeakF01 | AJ968940 | F: 5'-GCTCTCCACCAACCTAAACAA-3' R: 5'-AAAACGTCTCACCTTCTACT-3' | (TC) ₁₆ | 51,00 | F01 |
| CIRAD4TeakDa12 | AJ968941 | F: 5'-CGCACACAGTAGCAGTAGCC-3' R: 5'-GCCGAAAAAGAAAAACCAA-3' | (GA) ₄ (N) ₅ (GA) ₁₁ A(GA) ₄ | 51,00 | Da12 |
| CIRAD4TeakF02 | AJ968942 | F: 5'-CCGGTAAAAAGGTGTGTCA-3' R: 5'-GAGTGAAGTGCTAATGGA-3' | (TC) ₄ (AC) ₃ (N) ₁₆ (TC) ₁₁ | 51,00 | F02 |
| CIRAD4TeakH09 | AJ968943 | F: 5'-GCAAACCAACCTTACT-3' R: 5'-CCGTTAGCACTCCATT-3' | (GA) ₁₄ | 51,00 | H09 |

2.7 Amplificación utilizando metodología M13 Tailing

Se amplificó la colección de muestras de ADN de *T. grandis* con los 14 marcadores microsatélites validados, siguiendo la metodología *M13 tailing* descrita por Morillo y Miño (2011). En la Tabla 6 se detallan las concentraciones necesarias de los compuestos para la reacción en cadena de la polimerasa.

Tabla 6

Coctel de amplificación, metodología M13tailing. Fuente: Morillo y Miño, 2011.

| PCR | CI | CF | VOL. 1 rx (uL) |
|-------------------------|-------|------|-------------------|
| AGUA UP | | | 0,32 |
| BUFFER PCR (X) | 5,00 | 1,00 | 1,00 |
| MgCl ₂ (mM) | 25,00 | 2,50 | 0,50 |
| dNTP's (mM) | 5,00 | 0,20 | 0,20 |
| M13 700/800 | 1,00 | 0,16 | 0,80 |
| Primer (uM) F -M13 | 1,00 | 0,01 | 0,05 |
| Primer (uM) R | 10,00 | 0,16 | 0,08 |
| Taqpolimerasa (U/uL) | 5,00 | 0,05 | 0,05 |
| MUESTRA (ng/uL) | 5,00 | 2,00 | 2,00 |
| VOL. TOTAL (uL) | | | 5,00 |

Las reacciones PCR preparadas se sometieron a un programa térmico, en la Tabla 7 se describen los ciclos de temperaturas y tiempos necesarios para la amplificación de fragmentos SSR, con la metodología M13 tailing.

Tabla 7

Programa de amplificación, metodología M13 tailing. Fuente: Morillo y Miño, 2011.

| | T °C | TIEMPO | CICLOS |
|---|-------------|---------------|---------------|
| 1 | 94 °C | 2 min | 1 ciclo |
| 2 | 95 °C | 4 min | 1 ciclo |
| 3 | 95 °C | 1 min | 25 ciclos |
| 4 | TA °C | 2 min | |
| 5 | 72 °C | 2 min | |
| 6 | 72 °C | 10 min | 1 ciclo |
| 7 | 4 °C | 10 min | 1 ciclo |

2.8 Corrida electroforética de productos PCR y Genotipaje en el LI-COR 4300S

Se preparó un gel de poliacrilamida, empleando 20 ml de Gel Matrix KB Plus al 6.5%, 150 µl Persulfato de Amonio (APS) al 10% y 15 µl de TEMED, se colocó esta mezcla entre dos placas de vidrio, previamente lavadas con detergente y limpiadas con isopropanol, se colocó el peine invertido para generar una línea base y se dejó polimerizar por 1 hora. Polimerizado el gel se colocó el peine, se insertó en la línea base y se ensambló la placa de poliacrilamida en el equipo LI-COR 4300s, se realizó

una precorrida. Para la corrida electroforética se utilizó tampón TBE 1x KB Plus LICOR. Se ingresó la información requerida para la corrida electroforética en el programa SAGAGT-SSR, esta información incluye las tallas del marcador de peso molecular IRDye 700 u 800 nm, rango de tamaño de amplificación de cada marcador SSR y los nombres de las muestras. Se diluyó los productos de PCR en Blue Stop, en proporción 1:1, se denaturó las muestras a 95°C por 5 minutos y se cargó 1 uL de producto en el gel, dejando correr las muestras por una hora y media.

Posteriormente se analizó la imagen generada por la corrida en el programa SAGAGT, se señaló cada banda que representa un alelo con una “x”, se confirmó el genotipaje generando el reporte de datos genotípicos.

2.9 Análisis de Datos

Los datos obtenidos mediante el programa SAGAGT, se exportaron al programa Microsoft Excel, donde se elaboró una matriz genotípica con los tamaños de cada uno de los alelos que presenta un determinado locus, se la depuró de acuerdo a los motivos de cada locus, se disminuyeron en 19 pb las tallas alélicas (debido a la técnica *M13tailing*), La matriz genotípica se analizó con los programas: POWER MARKER 3.0 (Liu *et al.*, 2005), DARwin (Perrier, 2003), GenAlEx ver. 6.5 (Peakall y Smouse, 2005).

2.9.1 Diversidad Genética

El paquete estadístico de genética poblacional Power Marker V3.0 se empleó para determinar los parámetros de diversidad genética descritos a continuación:

Frecuencia Alélica: se la utiliza para cuantificar la variación genética. Verifica la presencia de un alelo existente dentro de una población; es decir, la proporción de todos los alelos de ese gen en la población que corresponden específicamente a ese tipo (IPGRI *et al.*, 2004). Se establece dividiendo el número de veces que se presenta

una forma alélica de un gen para el número total de alelos de ese gen en la población (Liu *et al.*, 2005).

Número de genotipos: Número de genotipos generados por locus (Liu *et al.*, 2005).

Disponibilidad: Porcentaje de accesiones en el que está presente un locus SSR. Se define como $1 - \text{Obs} / n$, donde Obs es el número de observaciones y n es el número de individuos incluidos en la muestra (Liu *et al.*, 2005).

Heterocigosidad Observada: Indica, para un número dado de loci, la proporción en una población de individuos heterocigotos. Se dice que un individuo es homocigoto si posee dos alelos idénticos en un mismo locus, e inversamente se dice que es heterocigoto si son dos alelos diferentes (Casal *et al.*, 2003). A mayor frecuencia de un alelo, existe menor heterocigosis. Para un solo loci está estimada (siguiendo las especificaciones de Liu *et al.*, 2005).

Heterocigosidad Esperada: Indica la proporción de individuos heterocigotos, calculada a partir de las frecuencias alélicas conocidas, suponiendo que la población está en equilibrio de Hardy-Weinberg. Se calculan por locus, población y especie, y permiten apreciar el potencial para una cría selectiva (Casal *et al.*, 2003).

Contenido de información de polimorfismo (PIC): El valor del PIC da un estimado del poder discriminatorio de un locus teniendo en cuenta el número de alelos expresados y la frecuencia relativa de estos alelos. El PIC tiene valores desde 0 cuando es totalmente monomórfico, hasta 1 cuando es altamente discriminativo, con muchos alelos con frecuencia similar (Alvarado, 2008).

Alelos exclusivos: Son aquellos que están presentes solo en una población o en individuos con una característica específica, por ejemplo en individuos que habitan en un lugar determinado o que presentan algún fenotipo característico (Alstad *et al.*, 1991).

2.9.2 Estructura genética

2.9.2.1 Análisis de Agrupamiento

Para realizar el análisis de agrupamiento se utilizó el programa DARWIN (Perrier, 2003), se determinó las distancias génicas entre las accesiones estudiadas y en consecuencia su respectivo Dendrograma. El coeficiente de similitud utilizado fue el SMC “Simple Matching Coefficient” (Sokal y Michener, 1958); el cual mide las coincidencias y diferencias entre dos genotipos mediante la siguiente fórmula:

$$SMC_{ij} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Donde i y j son los genotipos a comparar, a es el número de alelos compartido por ambos, b es el número de alelos presentes en i pero no en j, c es el número de alelos presentes en j pero no en i y d es el número de alelos ausentes en ambos. La suma a+b+c+d representa el número de clases alélicas encontradas en la muestra (Villamón, 2000). La matriz de similitud obtenida de esta forma, fue sujeta al análisis de grupos o clusters utilizando el algoritmo WARD con el programa Darwin, generando el dendrograma.

2.9.2.2 Métodos Multivariados

Para conocer la distribución de los genotipos se aplicó el método multivariado conocido como Análisis de Coordenadas principales (PCOA) y se empleó en los programas Darwin y el complemento de Excel GenA1Ex. Esta técnica es una forma de escalamiento multidimensional clásico la cual explora las similitudes (o distancias) entre observaciones y las muestra de forma gráfica. Es una técnica útil para mostrar distancias entre datos usando una medida de distancia alternativa expresada como función de un índice de asociación (Balzarini *et al.*, 2008).

Esta técnica nos muestra las relaciones entre observaciones, que se representan por distancias o similitudes, dentro de un plano tal que las distancias verdaderas sean preservadas tanto como sea posible. La técnica de escalamiento multidimensional usa

la matriz de distancia o de similitudes para construir la configuración de puntos en el plano.

2.9.2.3 Estadística F

Para calcular las estadísticas F se utilizó el software GenAlex ver. 6.5 (Peakall & Smouse, 2005), los parámetros son el índice de fijación (F_{is} o correlación entre los genes de los individuos (I) y los de la subpoblación (S)), y el grado de divergencia entre las poblaciones (F_{st} o correlación entre los genes de la subpoblación y los de la población total). Estas estadísticas permiten describir la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg observable para poblaciones que están estructuradas asumiendo que todas las poblaciones están en un mismo sitio que contribuyen de igual manera al acervo genético, y las poblaciones están ubicadas cercanamente unas con otras.

El F_{st} mide la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg entre las subpoblaciones. Es un parámetro comúnmente utilizado para determinar si existe flujo de genes entre subpoblaciones. Este valor considera la correlación de genes entre individuos de una población en comparación con el conjunto de la población. El valor F_{st} se mide en una escala de 0 a 1, mientras mayor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones (Nei, 1973).

$$F_{ST} = \frac{HT - HS}{HT}$$

Donde:

HT= Promedio de la heterocigocidad esperada en la población total para todos los loci.

HS= Promedio de la heterocigocidad esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci.

El F_{is} o coeficiente de consanguinidad intrapoblacional mide la desviación al equilibrio de Hardy-Weinberg en la subpoblaciones, es decir, estima la correlación de alelos entre individuos dentro de una subpoblación.

Un F_{is} positivo indica un exceso de homocigotos y un valor negativo un déficit en homocigotos. Si dos o más subpoblaciones tienen diferentes frecuencias alélicas entonces la heterocigosidad total se reduce, aún si las subpoblaciones mantienen el equilibrio de Hardy-Weinberg (Nei, 1973). El valor F_{is} se mide en una escala de -1 a 1.

$$F_{IS} = \frac{HS - HI}{HS}$$

Donde:

Hs= Promedio de la heterocigosidad esperada dentro de subpoblaciones para todos los loci.

HI= Promedio de la heterocigosidad observada para todas las subpoblaciones.

2.9.2.4 Análisis Molecular de Varianza

El análisis molecular de varianza AMOVA (Excoffier *et al.*, 1992) es un análisis jerárquico que nos permite observar la variación dentro y entre los componentes de una población usando distancias genéticas (Culley *et al.*, 2007). Para el análisis molecular de varianza se utilizó el software GenALEX versión 6.5 (Peakall *et al.*, 2012), analiza el total de la varianza en los componentes de la covarianza asociados con diferencias entre individuos dentro de poblaciones, entre individuos en diferentes poblaciones dentro de grupos y entre grupos (Culley *et al.*, 2007).

2.9.2.5 Identificación de genotipos duplicados

Se realizó la identificación de genotipos similares con la ayuda del complemento de Microsoft Excel Microsatellite Toolkit (Park, 2001) con un número de alelos no idénticos tolerados de 2 antes de rechazar un emparejamiento.

3 CAPÍTULO III- RESULTADOS

3.1 Caracterización Genética

3.1.1 Recolección del Material Vegetal

Se colectaron hojas medianamente maduras de los 90 árboles seleccionados en las estaciones experimentales de INIAP: Tropical Pichilingue (EETP) y Litoral Sur (EELS), la selección de los árboles se basó en características sobresalientes de los mismos, tales como: altura comercial del árbol y presencia de fuerte dominancia apical, posición sociológica, ausencia de ramas gruesas, de bifurcación y de aletones basales y el estado fitosanitario de la planta. Las hojas fueron secadas con sílica gel. En la figura 5 se observa la recolección de material vegetal.



Figura 5. Recolección de Material vegetal de Teca de la colección del INIAP Estación Experimental Tropical Pichilingue

3.1.2 Extracción y Cuantificación de ADN

La extracción con el protocolo descrito por Souza 2012, permitió obtener un rendimiento promedio de ADN genómico de 6,3 ug (Anexo 3)

En cuanto a la calidad del ADN extraído, se utilizó tratamiento enzimático con RNasa para eliminar contaminación con impurezas y de ARN. Los coeficientes de absorbancias OD260nm/OD280nm tuvieron en promedio un valor de 1.83 (anexo3).

3.1.3 Validación de ADN

Se validó la colección total de muestras de ADN de Teca utilizando el primer DA12 que fue previamente probado, en la Figura 6, se observa la validación de ADN de Teca.

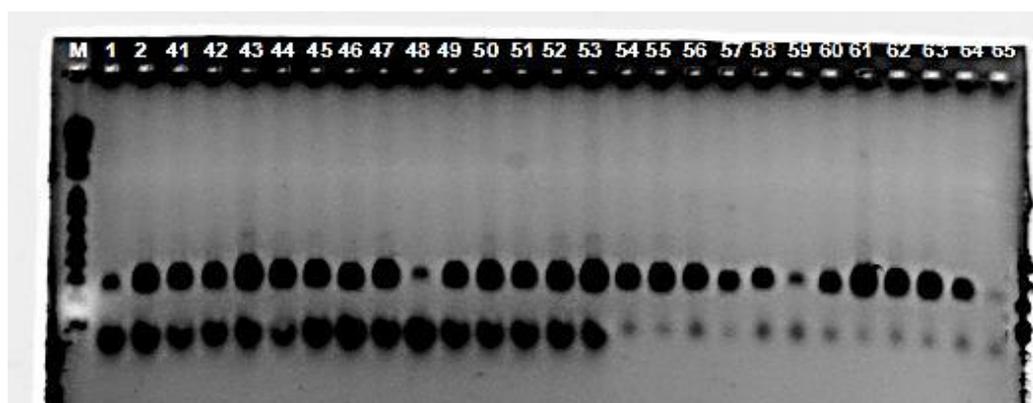


Figura 6. Validación ADNs de Teca utilizando el *primer* DA12, en gel de agarosa 2% (p/v) (Pocillo M: marcador de peso molecular 1kb plus de Invitrogen, en el pocillo 1 y 2 se encuentran los positivos y en los demás pocillos muestras de la 41 hasta la 65).

3.1.4 Validación de *Primers*

Se realizó la validación de los marcadores reportados por Verhaegen *et al.*, 2005, se verificó que validaron 14 marcadores (Tabla 8) utilizando la temperatura de *annealing* reportada.

Tabla 8

Marcadores microsatélites para Teca, amplificados con temperatura de *annealing* reportada.

| Marcadores microsatélites | Temperatura de <i>annealing</i> reportada |
|---------------------------|---|
| A06 | 51°C |
| B03 | 51°C |
| F05 | 51°C |
| G02 | 51°C |
| H10 | 51°C |
| B07 | 51°C |
| C03 | 51°C |
| A11 | 51°C |
| B02 | 51°C |
| Da09 | 51°C |
| E06 | 51°C |
| F01 | 51°C |
| Da12 | 51°C |
| F02 | 51°C |

En la Figura 7 Se observan las amplificaciones con los marcadores microsatélites para *T. grandis*, nombrados en la Tabla anterior.

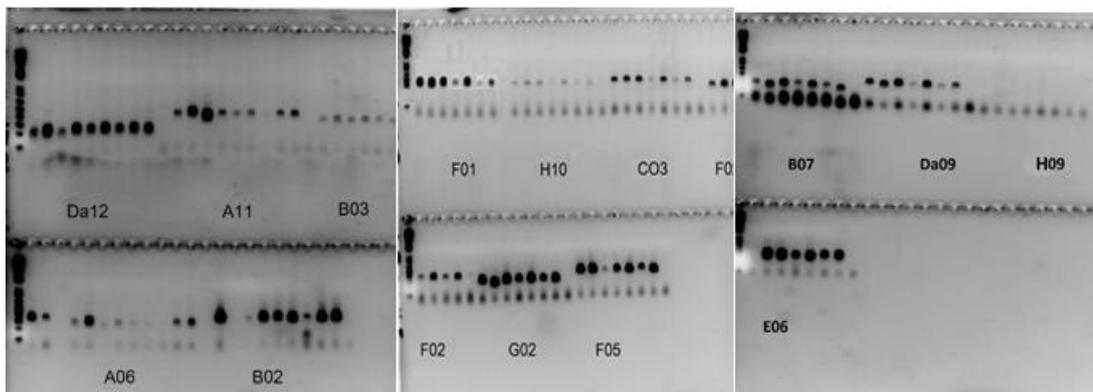


Figura 7. Validación de Primers microsatélites en gel de agarosa 2% (p/v) con 8 muestras de ADN genómico de *T. grandis*, utilizando el marcador de peso molecular 1kb plus de in vitro gen

El marcador H09 no presentó amplificación con la temperatura de *annealing* reportada, por tal razón se realizó una prueba con un gradiente de temperaturas de *annealing* (45, 51, 55, 60) °C. En la Figura 8 se visualizan los resultados de este ensayo, el marcador no presentó amplificación por lo que fue descartado del estudio.

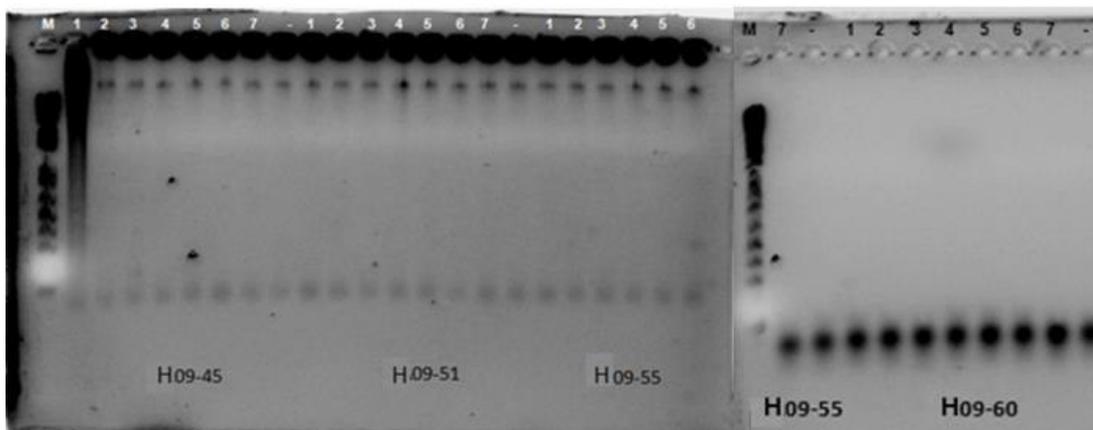


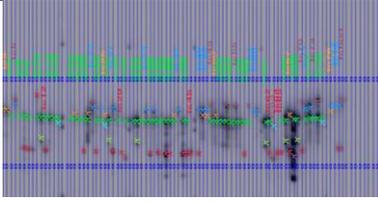
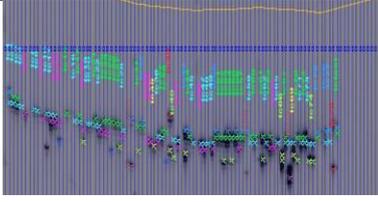
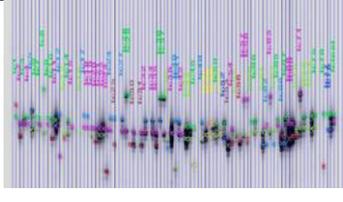
Figura 8. Validación de Primer H09 en gel de agarosa 2% (p/v), utilizando gradientes de temperatura de *annealing*, con 7 muestras de ADN genómico de *T. grandis* (Pocillo M: marcador de peso molecular 1kb plus de in vitro gen).

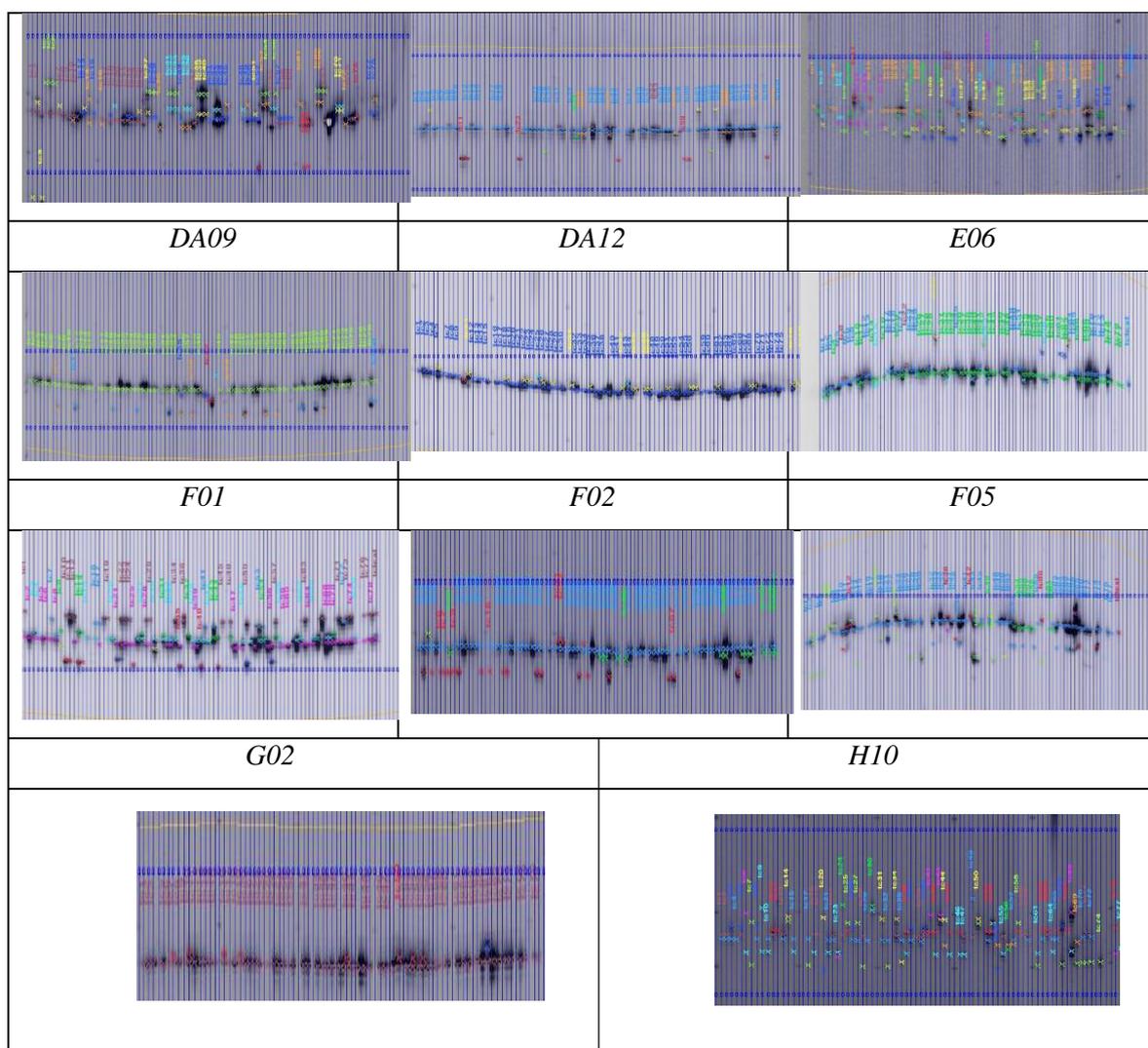
3.1.5 Amplificación, Corrida electroforética y Genotipaje en el LI-COR 4300S

Se analizó la imagen generada por el LI-COR 4300s, en el programa SAGAGT, se señaló cada banda que representa un alelo con una “x”, con lo que se obtuvo una matriz de datos genotípicos (anexo 4). En la Tabla 9 se observan las imágenes de los geles analizados en el LI-COR 4300s y genotipados con las bandas correspondientes a los productos de amplificación PCR.

Tabla 9

Geles de poliacrilamida, genotipados con el programa SAGAGT, utilizando ADN genómico de *T. grandis*.

| | | |
|---|--|---|
| A06 | A11 | B02 |
|  |  |  |
| B03 | B07 | C03 |



3.2 Análisis de Datos

3.2.1 Diversidad Genética

Se analizaron 90 muestras de *T. grandis*., pertenecientes a la colección del INIAP, las cuales presentaron 127 alelos en un rango de longitud de 113 pb a 281 pb, con un promedio de 9 alelos/locus. En la Tabla 10 se presentan resumidos los alelos registrados, así como el alelo más y menos frecuente de las muestras provenientes de la colección del INIAP. El marcador microsatélite G02 es el menos polimórfico con 4 alelos y el marcador H10 es más polimórfico con 17 alelos, poseen una heterocigosidad

esperada de 0,12 y 0,85 respectivamente con un índice de PIC para el G02 de 0,14 y para el H10 de 0,88.

Tabla 10

Resumen de la Diversidad genética presente en *T. grandis* de la colección del INIAP

| <i>Marcador</i> | <i>Mayor Frecuencia Alélica</i> | <i>Número de Alelos</i> | <i>Diversidad</i> | <i>Heterocigosidad Esperada</i> | <i>PIC</i> |
|-----------------|---------------------------------|-------------------------|-------------------|---------------------------------|------------|
| <i>A06</i> | 0.47 | 9.00 | 0.72 | 0.69 | 0.68 |
| <i>A11</i> | 0.35 | 9.00 | 0.79 | 0.70 | 0.76 |
| <i>B02</i> | 0.19 | 15.00 | 0.87 | 0.84 | 0.85 |
| <i>B03</i> | 0.32 | 11.00 | 0.82 | 0.77 | 0.79 |
| <i>B07</i> | 0.68 | 8.00 | 0.50 | 0.36 | 0.47 |
| <i>C03</i> | 0.25 | 12.00 | 0.86 | 0.65 | 0.85 |
| <i>DA12</i> | 0.8 | 5.00 | 0.34 | 0.25 | 0.30 |
| <i>E06</i> | 0.56 | 7.00 | 0.58 | 0.38 | 0.51 |
| <i>F01</i> | 0.33 | 9.00 | 0.77 | 0.72 | 0.74 |
| <i>F02</i> | 0.67 | 6.00 | 0.52 | 0.45 | 0.48 |
| <i>F05</i> | 0.63 | 8.00 | 0.58 | 0.55 | 0.56 |
| <i>G02</i> | 0.92 | 4.00 | 0.15 | 0.12 | 0.14 |
| <i>H10</i> | 0.19 | 17.00 | 0.89 | 0.85 | 0.88 |
| <i>DA09</i> | 0.79 | 7.00 | 0.37 | 0.28 | 0.35 |
| <i>Promedio</i> | 0.51 | 9.07 | 0.63 | 0.55 | 0.6 |

Diversidad genética de las accesiones provenientes de la EETP

Se analizaron las muestras por estaciones con un total de 127 alelos, se observó que en la EETP están presentes 78 alelos, los cuales presentaron un promedio de 5,6 alelos/locus, como se observa en la Tabla 11

Tabla 11

Resumen de la Diversidad genética presente en *T. grandis* de las accesiones provenientes de la EETP

| <i>Población</i> | <i>Marcador</i> | <i>Número de Alelos</i> | <i>Heterocigosidad Observada</i> | <i>Heterocigosidad Esperada</i> |
|------------------|-----------------|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| EETP | A06 | 7.00 | 0.50 | 0.72 |
| | A11 | 6.00 | 0.57 | 0.66 |
| | B02 | 8.00 | 0.70 | 0.79 |
| | B03 | 7.00 | 0.71 | 0.73 |
| | B07 | 4.00 | 0.36 | 0.41 |
| | C03 | 9.00 | 0.69 | 0.86 |
| | DA12 | 3.00 | 0.07 | 0.31 |
| | E06 | 4.00 | 0.42 | 0.54 |
| | F01 | 7.00 | 0.78 | 0.75 |
| | F02 | 4.00 | 0.57 | 0.47 |
| | F05 | 5.00 | 0.57 | 0.69 |
| | G02 | 2.00 | 0.14 | 0.13 |
| | H10 | 9.00 | 0.78 | 0.83 |
| | DA09 | 3.00 | 0.14 | 0.13 |
| | Promedio | 5.57 | 0.52 | 0.58 |

En la Tabla 12 se observan los alelos registrados para cada locus, así como el alelo más y menos frecuente de las muestras provenientes de la EETP. El locus H10 es el más polimórfico con 9 alelos y el locus G02 el menos polimórfico con 2 alelos. Existen 20 alelos menos frecuentes con una frecuencia alélica de 0,036 y 2 alelos más frecuentes con una frecuencia alélica de 0,929.

Tabla 12

Locus SSR con sus alelos registrados y frecuencia alélica en el estudio de variabilidad genética en *T. grandis* L. proveniente de EETP. En verde se muestran los alelos más frecuentes y en azul los alelos menos frecuentes.

| |
|-----|
| A06 |
|-----|

| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
|------------------|-------------|--------------------|
| | | |
| | 173 | 0.179 |
| | <i>177</i> | <i>0.036</i> |
| | 185 | 0.464 |
| | 187 | 0.143 |
| | 189 | 0.071 |
| | 191 | 0.071 |
| | <i>193</i> | <i>0.036</i> |
| A11 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 6 | <i>243</i> | <i>0.036</i> |
| | 247 | 0.071 |
| | 253 | 0.286 |
| | 255 | 0.500 |
| | 257 | 0.071 |
| | <i>259</i> | <i>0.036</i> |
| B02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 8 | <i>202</i> | <i>0.036</i> |
| | 207 | 0.107 |
| | 210 | 0.179 |
| | 212 | 0.214 |
| | 214 | 0.321 |
| | 216 | 0.071 |
| | <i>218</i> | <i>0.036</i> |
| | <i>224</i> | <i>0.036</i> |
| B03 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 7 | 194 | 0.071 |
| | 228 | 0.107 |
| | 230 | 0.464 |
| | 232 | 0.107 |
| | 234 | 0.107 |
| | <i>238</i> | <i>0.036</i> |
| | 243 | 0.107 |
| B7 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 4 | 113 | 0.107 |
| | 129 | 0.750 |

| | | |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|
| | 131 | 0.107 |
| | <i>139</i> | <i>0.036</i> |
| C03 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 9 | 257 | 0.154 |
| | 259 | 0.038 |
| | 261 | 0.154 |
| | 263 | 0.115 |
| | 265 | 0.077 |
| | 267 | 0.192 |
| | 269 | 0.154 |
| | 271 | 0.077 |
| | 273 | 0.038 |
| DA12 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 3 | 122 | 0.071 |
| | 123 | 0.821 |
| | 125 | 0.107 |
| E06 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 4 | <i>198</i> | <i>0.036</i> |
| | 200 | 0.286 |
| | 202 | 0.607 |
| | 204 | 0.071 |
| F01 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 7 | 182 | 0.143 |
| | <i>188</i> | <i>0.036</i> |
| | 190 | 0.429 |
| | 192 | 0.107 |
| | 194 | 0.107 |
| | <i>198</i> | <i>0.036</i> |
| | 200 | 0.143 |
| F02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 4 | 199 | 0.250 |
| | <i>206</i> | <i>0.036</i> |
| | 207 | 0.679 |
| | <i>211</i> | <i>0.036</i> |
| F05 | | |

| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
|------------------|-------------|--------------------|
| 5 | 233 | 0.179 |
| | 241 | 0.036 |
| | 249 | 0.464 |
| | 251 | 0.107 |
| | 253 | 0.214 |
| G02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 2 | 148 | 0.929 |
| | 150 | 0.071 |
| H10 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 9 | 213 | 0.036 |
| | 219 | 0.143 |
| | 225 | 0.286 |
| | 227 | 0.179 |
| | 229 | 0.107 |
| | 231 | 0.107 |
| | 233 | 0.071 |
| | 235 | 0.036 |
| | 237 | 0.036 |
| DA09 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 3 | 176 | 0.036 |
| | 178 | 0.036 |
| | 186 | 0.929 |

Diversidad genética de las accesiones provenientes de la EELS

Mientras que las muestras provenientes de la EELS presentaron 122 alelos con un promedio de 8.7 alelos/locus, en la Tabla 13 se muestra la diversidad genética para las accesiones provenientes de la EELS.

Tabla 13

Resumen de la Diversidad genética presente en *T. grandis* de las accesiones provenientes de la EELS

| Población | Marcador | Número de Alelos | Heterocigosidad Observada | Heterocigosidad Esperada |
|-------------|-----------------|------------------|---------------------------|--------------------------|
| EELS | A06 | 8.00 | 0.71 | 0.72 |
| | A11 | 9.00 | 0.72 | 0.79 |
| | B02 | 13.00 | 0.81 | 0.87 |
| | B03 | 11.00 | 0.79 | 0.82 |
| | B07 | 8.00 | 0.36 | 0.51 |
| | C03 | 12.00 | 0.65 | 0.85 |
| | DA12 | 4.00 | 0.29 | 0.34 |
| | E06 | 7.00 | 0.37 | 0.55 |
| | F01 | 9.00 | 0.71 | 0.76 |
| | F02 | 5.00 | 0.43 | 0.52 |
| | F05 | 8.00 | 0.54 | 0.54 |
| | G02 | 4.00 | 0.12 | 0.14 |
| | H10 | 17.00 | 0.86 | 0.89 |
| | DA09 | 7.00 | 0.31 | 0.40 |
| | Promedio | 8.71 | 0.55 | 0.62 |

En la Tabla 14 se observan los alelos registrados para cada locus, así como el alelo más y menos frecuente de las muestras provenientes de la EELS. El locus H10 es el más polimórfico con 17 alelos y el locus G02 el menos polimórfico con 4 alelos. Existen 13 alelos menos frecuentes con una frecuencia alélica de 0,007 y un alelo más frecuente con una frecuencia alélica de 0,921.

Tabla 14

Marcadores SSR con sus alelos registrados y frecuencia alélica en el estudio de variabilidad genética en *Tectona grandis* L. proveniente de EELS. En verde se muestra el alelo más frecuentes y en azul los alelos menos frecuentes.

| A06 | | |
|------------------|-------------|--------------------|
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 8 | 171 | 0.020 |
| | 173 | 0.191 |
| | 177 | 0.033 |
| | 183 | 0.026 |
| | 185 | 0.467 |
| | 187 | 0.059 |

| | | |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|
| | 189 | 0.138 |
| | 191 | 0.066 |
| A11 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 9 | 243 | 0.046 |
| | 247 | 0.039 |
| | 249 | 0.072 |
| | 251 | 0.039 |
| | 253 | 0.151 |
| | 255 | 0.322 |
| | 257 | 0.243 |
| | 259 | 0.079 |
| | 263 | 0.007 |
| B02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 13 | 198 | 0.014 |
| | 201 | 0.014 |
| | 207 | 0.155 |
| | 209 | 0.027 |
| | 210 | 0.176 |
| | 211 | 0.128 |
| | 212 | 0.196 |
| | 213 | 0.027 |
| | 214 | 0.115 |
| | 215 | 0.020 |
| | 216 | 0.074 |
| | 222 | 0.027 |
| | 224 | 0.027 |
| B03 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 11 | 194 | 0.013 |
| | 211 | 0.020 |
| | 223 | 0.013 |
| | 228 | 0.059 |
| | 230 | 0.296 |
| | 232 | 0.204 |
| | 234 | 0.059 |
| | 236 | 0.099 |
| | 238 | 0.066 |
| | 240 | 0.020 |
| | 243 | 0.151 |

| B07 | | |
|------------------|-------------|--------------------|
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 8 | 113 | 0.033 |
| | 117 | 0.013 |
| | 125 | 0.013 |
| | 127 | 0.200 |
| | 129 | 0.667 |
| | 131 | 0.053 |
| | 133 | 0.007 |
| | 139 | 0.013 |
| C03 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 12 | 255 | 0.122 |
| | 257 | 0.061 |
| | 259 | 0.182 |
| | 261 | 0.108 |
| | 263 | 0.027 |
| | 265 | 0.108 |
| | 267 | 0.257 |
| | 269 | 0.081 |
| | 271 | 0.027 |
| | 273 | 0.014 |
| | 277 | 0.007 |
| | 281 | 0.007 |
| DA12 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 4 | 121 | 0.007 |
| | 123 | 0.796 |
| | 125 | 0.164 |
| | 127 | 0.033 |
| E06 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 7 | 198 | 0.073 |
| | 200 | 0.613 |
| | 202 | 0.260 |
| | 204 | 0.007 |
| | 208 | 0.020 |
| | 210 | 0.013 |
| | 212 | 0.013 |
| F01 | | |

| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
|------------------|-------------|--------------------|
| 9 | 182 | 0.039 |
| | 184 | 0.020 |
| | <i>188</i> | <i>0.007</i> |
| | 190 | 0.316 |
| | 192 | 0.309 |
| | 194 | 0.072 |
| | 198 | 0.059 |
| | 200 | 0.171 |
| | <i>202</i> | <i>0.007</i> |
| F02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 5 | 199 | 0.127 |
| | 205 | 0.080 |
| | 206 | 0.100 |
| | 207 | 0.667 |
| | 209 | 0.027 |
| F05 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 8 | 233 | 0.060 |
| | <i>234</i> | <i>0.007</i> |
| | 239 | 0.053 |
| | 241 | 0.027 |
| | 243 | 0.087 |
| | 249 | 0.660 |
| | 251 | 0.080 |
| | 253 | 0.027 |
| G02 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 4 | <i>148</i> | <i>0.921</i> |
| | 150 | 0.053 |
| | <i>152</i> | <i>0.007</i> |
| | 154 | 0.020 |
| H10 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 17 | 211 | 0.034 |
| | 213 | 0.110 |
| | <i>215</i> | <i>0.007</i> |
| | 217 | 0.021 |
| | 219 | 0.103 |

| | | |
|-------------------------|--------------------|---------------------------|
| | 221 | 0.027 |
| | 223 | 0.068 |
| | 225 | 0.178 |
| | 227 | 0.130 |
| | 229 | 0.116 |
| | 231 | 0.062 |
| | 233 | 0.048 |
| | 235 | 0.048 |
| | 237 | 0.021 |
| | 239 | 0.007 |
| | 241 | 0.014 |
| | 245 | 0.007 |
| DA09 | | |
| Número de alelos | Alelos (pb) | Frecuencia Alélica |
| 7 | 176 | 0.061 |
| | 178 | 0.054 |
| | 182 | 0.034 |
| | 184 | 0.041 |
| | 186 | 0.764 |
| | 188 | 0.034 |
| | 192 | 0.014 |

3.2.2 Estructura Genética

3.2.2.1 Análisis de agrupamiento

En el análisis de agrupamiento se estimó la similitud de las muestras, empleando el coeficiente de similitud SM (Simple Matching), con el algoritmo Ward. Se obtuvo un dendrograma que representa las relaciones genéticas entre las 90 accesiones provenientes de la colección del INIAP en donde se observan dos grupos. El grupo A está conformado con 76 muestras de la EELS y el grupo B con 11 muestras provenientes de EETP y 3 muestras de EELS (TC29, TC43, TC57) (Figura 9).

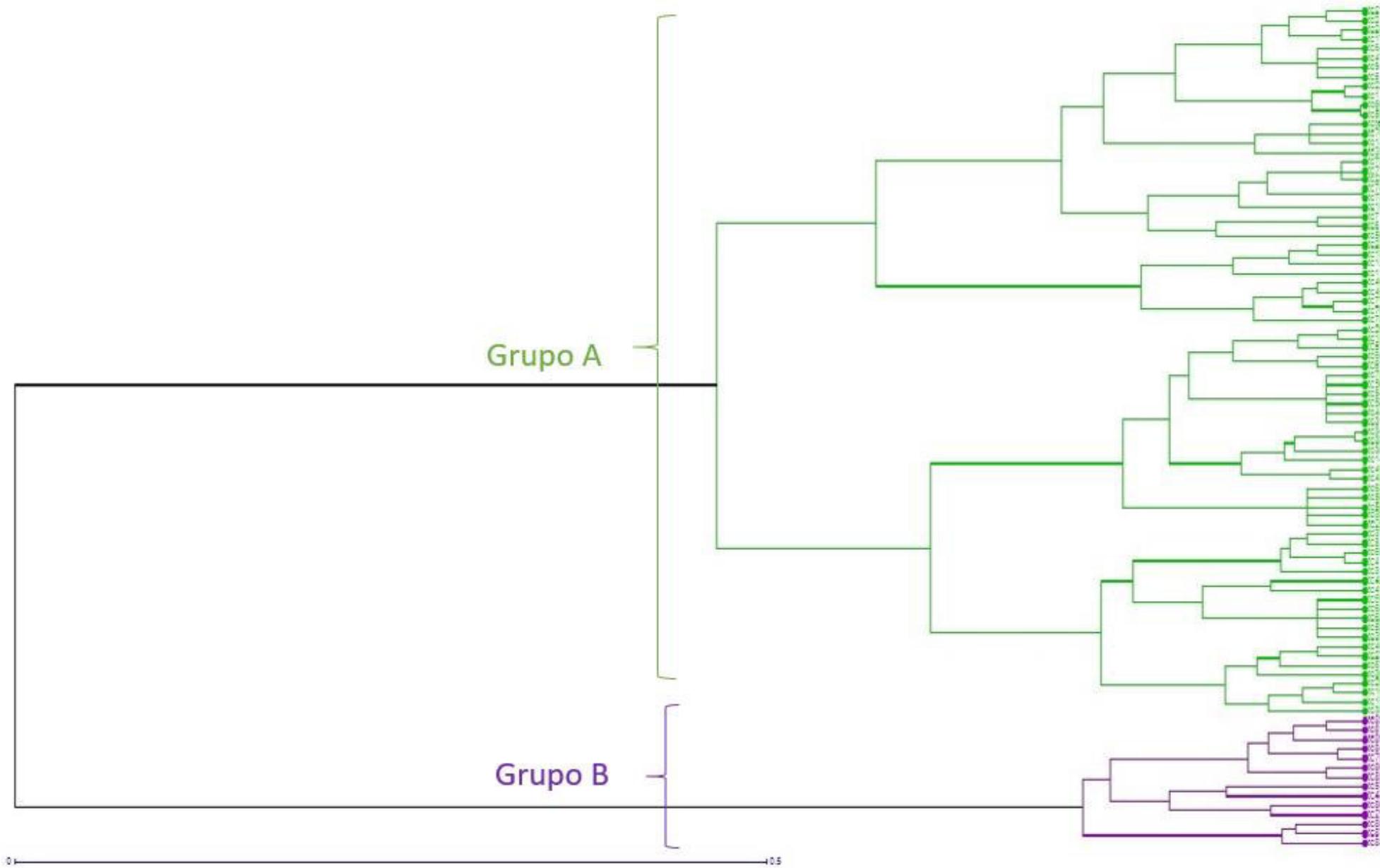


Figura 9. Dendrograma obtenido estimando la similitud (SM) con el algoritmo Ward para el análisis de agrupamiento de 90 accesiones provenientes del INIAP

3.2.2.2 Métodos Multivariados

El Análisis de coordenadas principales (PCOA), se utilizó el programa Darwin y se aplicó de manera conjunta a las accesiones del INIAP, teniendo por resultado la formación de 2 grupos, el grupo A conformado por 76 muestras de la EELS y el grupo B con 11 muestras provenientes de la Estación Experimental Tropical Pichilingue, se observa la presencia de un grupo intermedio formado por 3 muestras de EELS (TC29, TC43, TC57), que no se agrupan correctamente, es decir no se definen, por el grupo A o por el grupo B. En la Figura 10 se observa el PCOA realizado para la colección del INIAP.

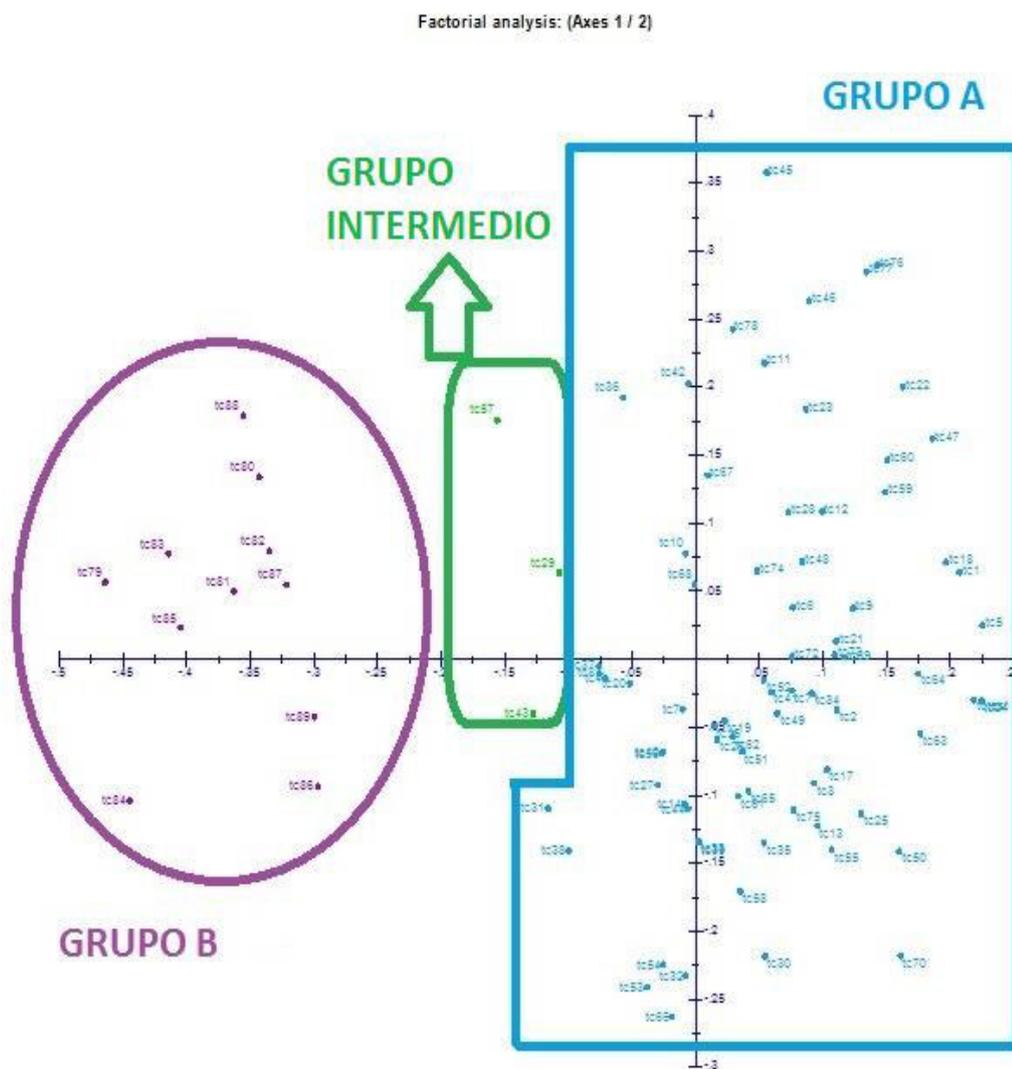


Figura 10. Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM del análisis simultáneo de las accesiones *Tectona grandis*, de la colección del INIAP

El análisis de coordenadas principales se lo realizó por procedencias utilizando el programa Gen Alex, en la Figura 3.7, se observa la formación de 4 grupos pertenecientes a cada procedencia (Santa Marta, Tanzania, Costa Rica y EETP), pero también se observa, la formación de dos grupos explicados en la Figura anterior en donde se verifica que las muestras que se encontraban en duda, son agrupadas de mejor manera en el grupo B.

En la Figura 11 se observan 4 grupos definidos cuando se agruparon las muestras por procedencias

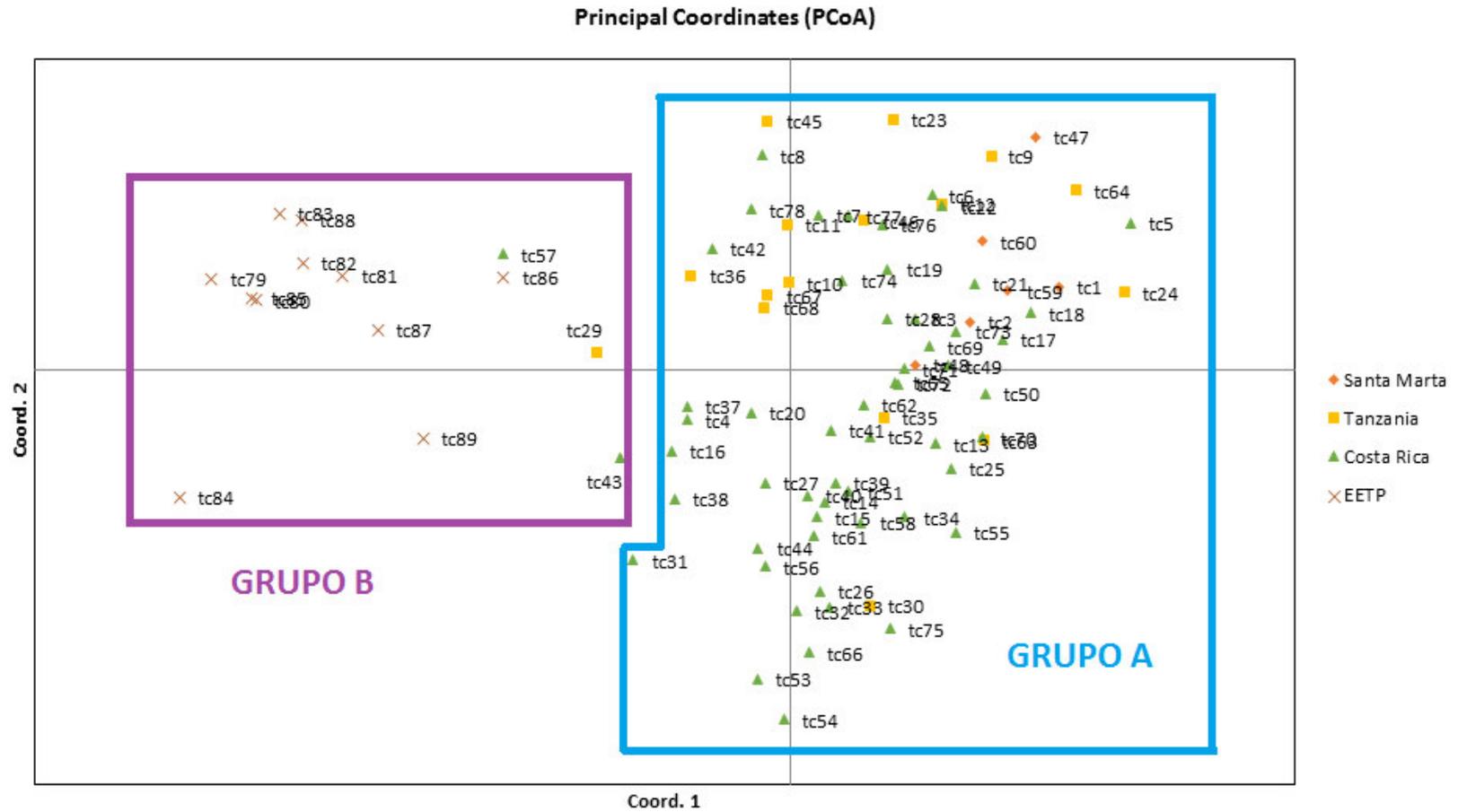


Figura 11. Análisis de coordenadas principales, obtenido con el coeficiente de similitud SM del análisis simultáneo de las procedencias *T. grandis*, de la colección del INIAP

En el Anexo 5, se observa detalladamente el análisis de coordenadas principales para cada una de las procedencias establecidas de *T. grandis* de la colección del INIAP.

Debido a que en dos de tres análisis existe la formación de dos grupos plenamente establecidos, se seguirá con el estudio basados en Grupo A con 76 muestras y el Grupo B con 14 muestras.

3.2.3 Estadística F

En el PCO (Figura 9), se observó la presencia de dos grupos que presentaron agrupación definida, el grupo A con 76 muestras provenientes de la EELS y el grupo B con un total de 14 accesiones, 11 muestras de la EETP y con 3 muestras de EELS, existe una diferencia considerable entre el grupo A y el grupo B por lo que la estadística F se aplicó a estos dos grupos, estableciendo ambos grupos como dos poblaciones diferentes. El índice de fijación logrado (2.4%) por lo que no indicó gran diferenciación entre GA y GB, además el locus SSR B02 presentó un valor negativo de endogamia (Tabla 15) lo que significa que para este locus existe gran número de heterocigotos.

Tabla 15

Endogamia total, Índice de fijación de accesiones de *Tectona grandis*, de la colección del INIAP.

| Marcador | Endogamia total (Fit) | Índice de fijación (Fst) |
|-----------------|------------------------------|---------------------------------|
| A06 | 0.161 | 0.005 |
| A11 | 0.135 | 0.030 |
| B02 | -0.065 | 0.020 |
| B03 | 0.053 | 0.019 |
| B07 | 0.247 | 0.029 |
| C03 | 0.233 | 0.019 |
| DA12 | 0.446 | 0.008 |
| E06 | 0.338 | 0.097 |
| F01 | 0.034 | 0.022 |
| F02 | 0.013 | 0.014 |
| F05 | 0.130 | 0.038 |
| G02 | 0.072 | 0.001 |
| H10 | 0.057 | 0.009 |
| DA09 | 0.187 | 0.029 |
| Promedio | 0.146 | 0.024 |

3.2.4 Análisis de AMOVA

El análisis molecular de varianza (AMOVA) realizado para examinar las diferencias genéticas que existe entre la población del grupo A y la población del grupo B, Se determinó que el 4% de la diversidad aporta a la diferenciación entre las poblaciones mientras que el 96% de la varianza está presente dentro de cada población, es decir, la varianza genética está distribuida heterogéneamente de tal manera que la mayor parte de la diversidad se encuentra dentro de cada población como se explica en la (Tabla 16).

Tabla 16

Análisis molecular de varianza de 2 grupos de poblaciones de *T. grandis* utilizando 14 primers SSR.

| Origen de la variación | g.l | Suma de cuadrados | Promedio de Cuadrados | Componente de Varianza | % variación genética |
|---------------------------|-------|-------------------|-----------------------|------------------------|----------------------|
| Entre poblaciones | 1.00 | 20.35 | 20.35 | 0.43 | 4% |
| Dentro de las poblaciones | 88.00 | 891.31 | 10.13 | 10.13 | 96% |
| Total | 89.00 | 911.66 | | 10.56 | 100% |

En la Figura 12 se observa gráficamente los resultados del AMOVA, realizados en los dos grupos poblaciones de Teca.

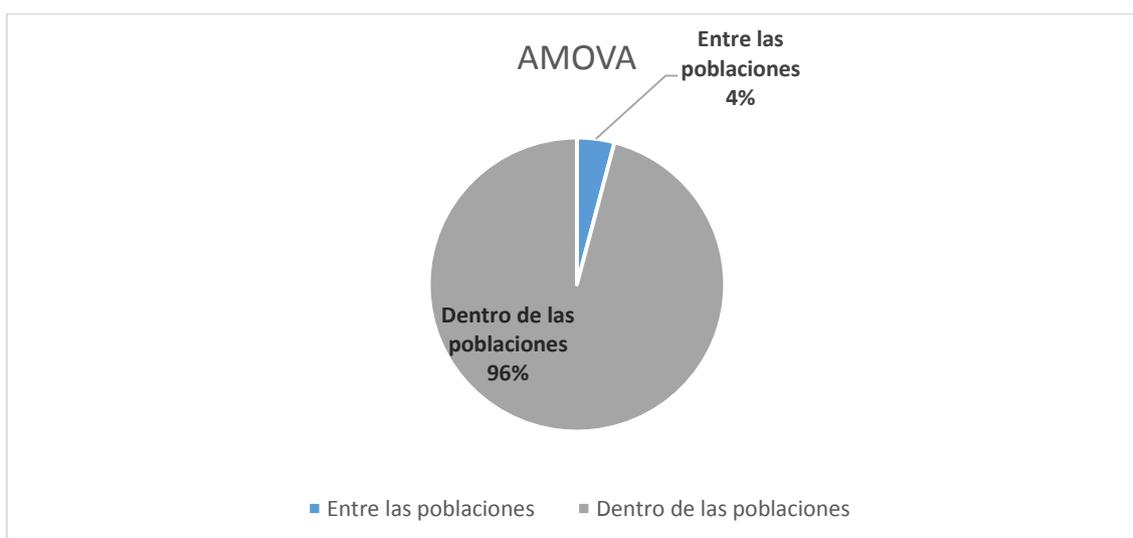


Figura 12. Porcentaje del análisis molecular de varianza de 2 grupos de poblaciones de *T. grandis*.

3.2.5 Identificación de genotipos duplicados

Para el análisis de duplicados se utilizó el complemento de Excel Microsatellite ToolKit, en la Tabla 17 se observa que las muestras tc 73 y la tc74 tienen un 92.86 % de similitud, la tc 59 y tc 60 tienen un 89.29 y tc 33 con tc 34 tienen 83.33%, lo que explica que no hay muestras duplicadas en el análisis.

Tabla 17

Identificación de duplicados de *T. grandis* de la colección del INIAP

| Muestra 1 | Muestra 2 | Porcentaje |
|------------------|------------------|-------------------|
| tc73 | tc74 | 92.86% |
| tc59 | tc60 | 89.29% |
| tc33 | tc34 | 83.33% |

4 CAPÍTULO IV - DISCUSIÓN

4.1 Recolección del Material Vegetal

Para la recolección del material vegetal se siguió el protocolo de Limongui *et al.*, (2015) en donde se observó las características fenotípicas de árboles sobresalientes de la colección del INIAP, lo que coincide con la opinión de Ipinza (1998), en la selección de este tipo de árboles, ya que permitirá usarlos como progenitores en las poblaciones de mejoramiento genético y de producción.

Las características tomadas en cuenta fueron: árboles dominantes, diámetro superior al promedio del rodal, tronco recto y cilíndrico, poseer ramas cortas, de poco diámetro y de ángulo de inserción en el tronco lo más cercano a 90 grados, poseer pocas ramificaciones en el tronco, presentar una buena tolerancia a enfermedades y plagas.

4.2 Extracción, cuantificación y validación de ADN

Para la obtención de ADN de la colección de *T. grandis*, se emplearon hojas secas medianamente maduras de la colección del INIAP. Se utilizó el proceso de extracción de Souza, (2012), el cual utiliza tampón de sorbitol para remover polisacáridos y el tampón de CTAB para la extracción de tejidos y la precipitación de polisacáridos, obteniendo de esta forma altas concentraciones de ADN y un rendimiento promedio de 6.3 ug. Nieto (2013), en su estudio con *T. grandis*, confirma el uso de hojas medianamente maduras en la extracción, para la generación de altas concentraciones de ADN, debido a que el uso de hojas jóvenes dificulta la extracción, ya que estas presentan altas concentraciones de taninos y polisacáridos (Matew, 1998).

El uso de ARNasa permitió eliminar contaminantes y ARN que probablemente se encontraban presentes en las muestras durante el proceso de extracción, dando como resultado un índice de pureza de 1.83, valor que según Mazo, (2011) está dentro de los rangos entre 1.8 – 2.0, lo que significa que el DNA se encuentra libre de contaminantes celulares. Lo anteriormente expuesto concuerda con lo reportado por Ferreira y Grattapaglia (1998) quienes mencionaron que un valor mayor al de los rangos permitidos presentan excesos de impurezas y la degradación del ADN, siendo éstas las causas más comunes del fracaso al trabajar con marcadores moleculares en especies vegetales.

Para la validación de ADN de la colección de *T. grandis* del INIAP, se utilizó el primer DA12, en donde se verificó que todas las muestras amplificaron correctamente y se ratificó que el protocolo de extracción empleado fue idóneo.

4.3 Validación de cebadores (*primers*)

De los 15 marcadores microsatélites reportados en la investigación de diversidad y estructura genética de *T. grandis* de Verhaegen *et al.*, (2005), amplificaron 14. El *primer* que no amplificó fue el H09, por lo que se realizó una nueva prueba con gradientes de temperatura de alineamiento siguiendo las especificaciones de Espinoza (2003), ya que si a temperaturas estándares el PCR no tiene buenos resultados se pueden hacer variaciones en la temperatura de alineamiento, por lo que se probó con (45, 51, 55, 60) °C; sin embargo, la prueba de gradientes no presentó resultados, por lo tanto el marcador microsatélite H09 fue descartado en el estudio.

4.4 Diversidad Genética

En el estudio de Diversidad Genética de *T. grandis* de la colección del INIAP se encontraron 127 alelos, utilizando 14 marcadores moleculares microsatélites. Inza *et al.*, (2009) encontró 180 alelos en una población natural de *T. grandis*, provenientes de India, Tailandia y Laos. En ese estudio se utilizó los mismos marcadores de esta investigación que fueron creados por Verhaegen *et al.*, (2005). Pero hay que considerar que para comparar las investigaciones se descartó el *primer* H09 por sus resultados negativos. Las diferencias entre estos resultados pueden deberse a las diferentes procedencias de las muestras. Adicionalmente cabe recalcar que según Innes *et al.*, (1994), la variabilidad genética en especies cultivadas como es el caso de Ecuador, es menor que las especies naturales, debido a que existe pérdida de variación; esta pérdida significa pérdida de germoplasma y, por consiguiente disminución en la plasticidad.

El marcador H10 fue el más polimórfico con: 17 alelos y heterocigosidad esperada de 0.85, y el menos polimórfico con: 4 alelos y heterocigosidad esperada de 0.11 fue el G02, lo cual coincide con el estudio de Inza *et al.*, (2009) en el que el H10 es un marcador con: 17 alelos y heterocigosidad esperada de 0.86, el menos polimórfico el G02 con: 3 alelos y heterocigosidad esperada de 0.28. Esto demuestra la replicabilidad de los resultados y la

fortaleza de los microsatélites como marcadores moleculares. El índice PIC está estrechamente relacionado con la heterocigosidad y pueden ser considerados equivalentes (Anderson *et al.*, 1993). Por lo que el índice PIC para el G02 fue de 0.14 y para el H10 fue de 0.88.

4.5 Estructura Genética

El análisis de agrupamiento reveló que las accesiones del INIAP comparten ciertas características que les permitieron agruparse. En el dendrograma se presentan dos grupos definidos el grupo A con 76 muestras de EELS y el grupo B con 14 muestras, 11 pertenecientes a la EETP y 3 de la EELS.

Para elegir el coeficiente de similitud para crear dendrograma, no existe un criterio universal de elección, pero se acuerda en que la elección dependerá del peso que se desea dar a las frecuencias *a*, *b*, *c* y *d*, el tipo de datos y la situación experimental (Legendre y Legendre, 1979; Gower y Legendre, 1986). Cuando se analiza marcadores codominantes, se puede trabajar con: los coeficientes de similitud de Jaccard, Simple Matching, Dice o Roger cuando se codifique sobre alelos. El coeficiente Simple Matching ha sido utilizado en estudios de marcadores moleculares SSR en varios organismos diploides (Demey, 2008), en el estudio Inza *et al.*, (2011), concuerda que este coeficiente de similitud es el ideal para estudios de diversidad genética.

El algoritmo utilizado fue Ward, es uno de los más utilizados en la práctica debido a que posee casi todas las ventajas del método de la media y suele ser más discriminativo en la determinación de los niveles de agrupación. Una investigación llevada a cabo por Kuiper y Fisher (1975) probó que este método era capaz de acertar mejor con la clasificación óptima que otros métodos (mínimo, máximo, media y centroide).

El análisis de coordenadas principales en la colección del INIAP dio como resultado la formación de dos grupos, sin embargo se generó duda en tres especies pertenecientes a la EELS, ya que estas no se agrupan adecuadamente, puesto que se observa que están en el medio de los dos grupos, en un estudio realizado por Cañadas *et al.*, (2013) en la EETP, expone que la falta de manejo y cuidado de los cultivos de Teca pudo haber generado problemas de endogamia en

las poblaciones, los cuales afectan caracteres cuantitativos como: tamaño, vigor, fertilidad y rendimiento de producción.

Mientras que el análisis de coordenadas principales realizado con procedencias, se agrupa de mejor manera, y permite observar la formación de dos grupos claramente establecidos, lo cual tiene concordancia con lo observado en campo. Se debe tomar en cuenta que las primeras semillas de Teca sembradas en el Ecuador fueron provenientes de la India en el año de 1950, las cuales se plantaron en la EETP (Nieto, *et al.*, 2013), por lo que al analizar la estructura genética, se forman dos grupos definidos, el grupo B posee plantas antiguas de la EETP, mientras que el grupo A conformado por otras procedencias, las cuales ingresaron al país luego de algunos años y que corresponden a plantas clones en las que la variabilidad se reduce (Schuhli y Paludzyszyn-Filho, 2010).

4.6 Estadística F

En el estudio realizado con *T. grandis*, se observa que no todas las estimaciones de F_{IT} fueron positivas, el marcador microsatélite B02 tuvo un número negativo que indica que existió gran número de heterocigotos, los demás marcadores fueron ligeramente diferentes de cero, el promedio de F_{IT} presentó un valor de 0.15, razón por lo cual Harvey *et al.*, (2007) sugiere que no hay un exceso de homocigotos y heterocigotos en cada uno de los grupos poblacionales estudiados.

El promedio de F_{ST} tuvo un valor de 0.024, significativamente diferente de cero, lo cual indica que la diferenciación genética entre las poblaciones es baja (Hartl y Clark, 1997). Expresando en porcentajes significa que el 2,4% del total de la variación, se distribuye entre las poblaciones y el 97.8 % de la variación se encuentra dentro de las poblaciones. Esto nos indica que los marcadores moleculares SSR mostraron una ligera diferenciación entre los grupos poblacionales estudiados y que no existe déficit de heterocigotos, lo cual se diferencia con los valores obtenidos para *T. grandis* en el estudio realizado por Inza *et al.*, 2009 en el que tuvo un promedio de F_{ST} de 0.21, valor que indica una gran diversidad genética (Hartl, 1989), lo que podría deberse a que ese estudio se enfocó en poblaciones naturales y este en poblaciones sembradas.

La baja diversidad genética, se puede explicar debido a la baja tasa de fecundación de la teca. El período de floración se da en la estación lluviosa lo que provoca que los insectos

polinizadores sean más reacios a volar, y adicionalmente el agua se lleva el estigma y los granos de polen antes de que se produzca la fecundación. (Hedegart 1975). Adicionalmente, esta es una planta introducida que puede tener polinizadores específicos que no se encuentran en nuestros ecosistemas, lo que afectaría el proceso de reproducción. Sabemos que la Teca tiene una polinización cruzada. Según González (2013) la polinización cruzada es ventajosa, ya que incrementa el grado de variabilidad, produciendo individuos más vigorosos con mayor probabilidad de florecer y sobrevivir además de ayudar a la formación de nuevas combinaciones de factores hereditarios, siempre y cuando los organismos tengan las condiciones favorables para dicha polinización.

4.7 Análisis de AMOVA

El análisis de varianza molecular (AMOVA) realizado para examinar las diferencias existentes en las poblaciones, indica que la mayor diversidad genética se debió a la variabilidad existente dentro de los 2 grupos poblacionales con un 96% y un 4% que corresponde a la variabilidad entre las poblaciones. Estos resultados indican la diferenciación genética dentro de los 2 grupos poblacionales, revelan la homogeneidad de las poblaciones en estudio. Comparando con los valores de F_{st} , se observa que los resultados son muy similares y se mantiene que la mayor diferenciación genética se encuentra dentro de las poblaciones.

De acuerdo a Salhi-Hannachi *et al.*, (2005), la baja diversidad entre las poblaciones y la gran variabilidad detectada dentro las mismas podrían estar explicadas por la ocurrencia del flujo génico en poblaciones naturales de las cuales se originaron estas poblaciones o bien pudieran tener un origen común.

4.8 Identificación de Duplicados

Los marcadores SSR ayudan de manera efectiva para identificar materiales duplicados en la colección de *T. grandis* (Struss y Plieske, 1998) y son muy útiles en la protección y el manejo de dichas colecciones. Los 14 marcadores seleccionados en este estudio fueron capaces de detectar un total de 6 genotipos que compartían ciertos porcentajes de identidad, pero no hubo resultados que indiquen un 100% de muestras idénticas.

Según van Hintum y Künpffer (1995) existen algunos tipos de duplicación: (1) la duplicación idéntica, cuando accesiones son genéticamente idénticas, (2) la duplicación común que se refiere a aquellas accesiones derivadas de la misma población de parentales, (3) duplicación parcial y compuesta donde no todos los alelos están duplicados y (4) duplicación parental referida a las relaciones entre cruces, progenies y parentales. Por lo que podemos decir que los resultados obtenidos tuvieron una duplicación parcial y compuesta donde no todos los alelos están duplicados.

5 CAPITULO V: CONCLUSIONES

El protocolo de extracción de ADN de *T. grandis* desarrollado por Souza *et al.* (2012) empleado en este estudio, evidenció un buen rendimiento, el producto extraído fue cualitativamente adecuado para la amplificación con marcadores moleculares SSR.

La caracterización molecular de 90 muestras de *T. grandis* utilizando 14 marcadores moleculares microsatélites, reveló una riqueza alélica de 127 alelos, con lo que se obtuvo un promedio de 9 alelos/locus.

La heterocigosidad esperada promedio de 0.55, indica que los microsatélites seleccionados forman un conjunto de mediana utilidad informativa para la caracterización de *T. grandis*.

El PIC promedio de 0.6 demostró que existe polimorfismo y diversidad genética en las muestras de *T. grandis* analizadas.

El marcador microsatélite con mayor polimorfismos de acuerdo a los datos de riqueza alélica, heterocigosidad esperada, PIC, fue el H10.

Con la combinación de microsatélites empleada, se pudieron establecer dos grupos en la colección de *T. grandis* perteneciente al INIAP.

El Análisis de Conglomerados bajo el algoritmo Ward sobre la matriz de coordenadas principales reflejó una conformación de 2 grupos o clusters, ya que este algoritmo suele ser más discriminativo en la determinación de los niveles de agrupación.

Los análisis de multivariados PCOA corroboraron la formación de dos grupos poblacionales en *T. grandis*.

El análisis de coordenadas principales realizado procedencias, permitió observar la formación de 4 grupos pertenecientes a Tanzania, Santa Marta, Costa Rica y EETP.

El análisis molecular de varianza determinó que la contribución a la mayor diversidad genética se debió a las diferencias dentro de cada grupo poblacional.

No existieron duplicados con un 100% de identidad, los resultados obtenidos tuvieron una duplicación parcial y compuesta donde no todos los alelos están duplicados.

6 CAPITULO VI: RECOMENDACIONES

Para futuras investigaciones es recomendable realizar un estudio de *T. grandis* utilizando otros marcadores SSR, para determinar si estos muestran mayor polimorfismo que los utilizados en este estudio.

Se deben analizar las 3 muestras que no se agruparon correctamente, utilizando un mayor número de marcadores moleculares.

Realizar un estudio de secuenciación para identificar variaciones puntuales e identificar alelos mayor precisión.

Se recomienda utilizar descriptores morfológicos, los cuales son, más informativos para posteriores caracterizaciones de poblaciones de *T. grandis*.

7 CAPITULO VII: BIBLIOGRAFÍA

- Alcântara, B., Veasey, E. (2013). Genetic diversity of teak (*T. grandis*) from different provenances using microsatellite markers. *Árvore*. 37(4):747-758.
- Alstad, D., Hotchkiss, S., Corbin, K. (1991). Gene flow estimates implicate selection as a cause of scale insect population structure. *Evolutionary Ecology*, 5, 88-92.
- Alvarado, C. (2008). Caracterización fenotípica y molecular de la diversidad genética de papas cultivadas por su tolerancia al endulzamiento en frío. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas. E.A.P de Ciencias Biológicas. Lima-Perú.
- Anderson, J., Churchill, G., Autrique, J., SD., T., & Sorrells, M. (1993). Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome*, 36:181-186.
- Argen-Bio. (2007). Marcadores moleculares. Disponible en: <http://www.porquebiotecnologia.com.ar/index.php?action=cuaderno&opt=5&tipo=1¬e=108>. Consultado el: 06 de Agosto del 2016
- Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., Casanoves, F., Di Rienzo, J. y Robledo C. (2008). Manual del Usuario InfoStat. Editorial Brujas. Córdoba, Argentina.
- Briscoe, C. (1995). Silvicultura y manejo de teca, melina y pochote. *Catie / Madeleña. Serie técnica. Informe técnico No. 270*. Turrialba, C.R. 43 p.
- Bruford, M., Wayne, R. (1993). Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion in Genetics and Development*, 3:939-943.
- Bryndum, Knud; Hedegart, Torben. 1969. Pollination of teak (*Tectona grandis L.*). *Silvae Genetica*. 18(3): 77- 80
- Cañadas, A., Rade, D., Zambrano, C., Molina, C., Arce, L. (2013). Evaluación y manejo de fuentes semilleras de Teca (*Tectona grandis Linn. f.*) en la Estación Experimental Tropical Pichilingue, Ecuador. Disponible en: http://www.usfq.edu.ec/publicaciones/avances/archivo_de_contenidos/Documents/volumen_5_numero_1/B64-5-1-2013.pdf. Consultado el: 03 de Noviembre del 2016.
- Casal, C. y Agustin, L. (2003). Las informaciones acerca del patrimonio genético son importantes para la acuicultura y la gestión de las poblaciones. Disponible:

- www.fishbase.us/Manual/Spanish/fishbasethe_elecdat_table.htm. Consultado el: 28 de Julio del 2016
- Chable, A. (1997). Reforestation in the Republic of Honduras, Central America. *Ceiba*. 13(2): 1-56.
- Chaves, E., Fonseca, W. (1991). Teca, *Tectona grandis L.f.*, especie de árbol de uso múltiple en América Central. Informe Técnico 179. Turrialba, Costa Rica: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 47 p
- Cheliak, W., 1993. Clone identification. In: Clonal Forestry I, Genetics and Biotechnology. Ed. By M.R. Ahuja and W.J. Libby. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 107-164.
- Culley. T., Sbita. S., Wick. A. (2007). Population genetic effects of urban habitat fragmentation in the Perennial Herb *Viola pubescens* (Violaceae) using ISSR markers. *Annals of Botany*. 27. 83-93
- Del Villar, J., Reynoso, G. (2010). Caracterización molecular mediante la técnica de microsatélites de dos materiales genéticos de aguacate (*Persea americana Mill.*) cultivados en la República Dominicana. República Dominicana: Universidad ISA.
- Demey, J., Vicente-Villardón, J., Galindo-Villardón, M., & Zambrano, A. (2008). Identifying molecular markers associated with classification of genotypes by External Logistic Biplots. *Bioinformatics*, 1-7.
- Flores, T., Crespo, R., Cabezas, F. (2010). Plagas y enfermedades en plantaciones de teca (*Tectona grandis L.F*) en la zona de Balzar, provincia del Guayas. *Ciencia y Tecnología*. 3(1):15-22.
- Ecobosques. (2015). Revisado el 15 de mayo del 2016. Disponible en: <http://www.ecobosques.com/noticia.php?id=72>
- ELAGRO. (2014). Productores madereros optimistas con programa de incentivos. Disponible en: <http://www.revistaelagro.com/2013/03/14/productores-madereros-optimistas-con-programa-de-incentivos>. Consultado el: 09 de junio del 2016.
- Espinoza, Laura, (2003). Guía práctica sobre la técnica de PCR. Capítulo 17. 517 p. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf>. Consultado el: 13 de Julio del 2016
- Ellegren, H. (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nat Rev Genet* 5(6):435-445

- Excoffier, L., Laval, G. y Schneider, S. (2006). Arlequin ver. 3.1: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1, 47-50.
- Ferreira, M., Grattapaglia, D. (1998). *Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético*. 3ª ed. Embrapa-Cenargen. Brasilia. 218 p.
- Fonseca, W. (2004). Manual para productores de Teca (*Tectona grandis L. f*) en Costa Rica. (En línea). Cr. Características y Propiedades de la madera. Disponible en http://www.fonafifo.com/text_files/proyectos/manualProductoresTeca.pdf. Consultado el 27 jul. 2016.
- Gill, B., Bedi, Y., Bir, S. (1983). Cytopalynological studies in woody members of family Verbenaceae from north-west and central India. *India: J Indian Bot Soc* 62:235–244.
- Gonzalez, A. (2013). *Morfología de Plantas Vasculares - Facultad de Ciencias Agrarias, Sgto. Cabral* 2131. Disponible en: <http://www.biologia.edu.ar/botanica/tema23/poliniza-abierta.htm>. Consultado el: 10 de Noviembre del 2016.
- González, B. (2007). Caracterización genética con microsatélites de un ensayo de progenie de teca (*Tectona grandis Linn F*) en San Mateo de Alajuela Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 67 p.
- Gower, & Harding, S. (1988). Nonlinear biplots. *Biometrika*, 75(3):445-455. KUIPER, F. K. Y FISHER, L. (1975) “A Monte Carlo comparison of six clustering procedures“ en “*Biometrics*”. Vol (31), p. 777-783.
- Greif, G. (2005). *Reacción en cadena de la polimerasa*, unidad de Biología Molecular, Institut Pasteur Montevideo.
- Gupta, P., Varshney R. (2000). The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. Volume 113, Issue 3, 63-185 p.
- Hartl, D., Clark, A. (1989) *Principles of Population Genetics*. 2nd Ed. Sinauer, Sunderland MA.
- Hartl, D., Clark, A. (1997) *Principles of Population Genetics*, 3rd Ed. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts (1997), p. 542
- Harvey, C, Saenz, J. (2007). *Evaluación y conservación de biodiversidad en paisajes naturales fragmentados de Mesoamerica*, 1ra Ed. Instituto Nacional de Biodiversidad InBio, Santo Domingo de Heredia.

- Hedegart, T. (1975): "Seed" collection of teak. En Report on FAO/DANIDA Training Course on Forest Seed Collection and Handling, Vol. 2, FAO, Roma.
- Hijmans. R, Cruz. J y Guarino. L. (2006). DIVA-GIS (version 7.5) 2011, Free mapping Program, available from <http://www.diva-gis.org/>. Consultado el: 14 de Julio del 2016
- Hillis, D., Wiens, J. (2000). Molecules versus morphology in systematics. In: J.J.Wiens (ed.). Phylogenetic analysis of morphological data. Smithsonian Institution Press. Washington. pp. 1-19.
- Innes, J., B.D. Harrison, C. J. Leaver y M.W. Bevan. 1994. The Production and Uses of Genetically Transformed Plants. Chapman & Hall. NY., Estados Unidos.
- Inza Jesus Fofana, Daniel Ofori, Mireille Poitel, Daniel Verhaegen. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis L.f*) in its natural range using DNA microsatellite markers. New Forests, Springer Verlag, 2009, 37, pp.175-195. <cirad-00845641>
- IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute), Universidad Cornell. (2004). Genética de Poblaciones. Disponible en: http://biologiamyblog.files.wordpress.com/2010/03/iigen_tica_de_poblaciones1.pdf. Consultado el: 20 de Julio del 2016
- Ipinza, R. (1998). Métodos de Selección de Arboles Plus. Disponible en: https://www.researchgate.net/publication/255949339_Metodos_de_Seleccion_de_Arboles_Plus. Consultado el: 13 de Julio del 2016
- Jarne, P, Lagoda. P. (1996). Microsatellites, from molecules to population and back. Trends in Ecology and Evolution, 11: 424-429.
- Jehle, R., Arntzen, J. (2002). Review: microsatellite markers in amphibian conservation genetics. Herpetological Journal, 12: 1-9.
- Kadambi, K. (1972). Silviculture and management of teak. Bull. 24. Nacogdoches, TX: Stephen F. Austin State University, School of Forestry. 137 p.
- Lamprecht, H. (1990). Silvicultura en los trópicos. Traducido por Antonio Carrillo. GTZ. Eschborn. 335 p.
- LI-COR Biosciences. (12 de 05 de 2012). Biotechnology, Advanced Discovery with. Obtenido de www.licor.com/bio/applications/applications.jsp
- Limongi, R. (2015). Estrategia de mejoramiento genético forestal para la costa del Ecuador. P

- Little, Elbert L, Jr. Wadsworth, Frank. H. (1964). Common trees of Puerto Rico and the Virgin Islands. Agric. Handb. 249. Washington, DC: U.S. Department of Agriculture. 548 p
- Liu, K. y Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21, 2128-2129.
- Mazo, C. (2011). Evaluación Y Comparación De 3 Protocolos De Extracción Y Amplificación Del ADN Contenido En Exsiccados De Orquídeas Conservadas En Colecciones De Herbario. Pontificia Universidad Javeriana-Bogotá. Disponible en: <http://repository.javeriana.edu.co/handle/10554/8874>. Consultado el: 12 de julio del 2016
- Matthew D., Davey M., Brian J., Lowe K., Bligh F., Roach S., Jones C. (1998). Dna Isolation And Aflp Genetic Fingerprinting Of *Theobroma Cacao* (L.). *Plant Molecular Biology Reporter* 16: 49–59.
- Moreno, C. (2001) Métodos para medir la biodiversidad M & T- Manuales y Tesis SEA, vol. 1. Zaragoza.84: 922495:2:8
- Morillo, E., Miño G. (2011). Marcadores moleculares en Biotecnología Agrícola: Manual de procedimientos y técnicas en INIAP. In E. E. Instituto Autónomo de Investigaciones Agropecuarias. Quito.
- Nieto, J., Hernández, S., Motte, E., Mayek, N. (2013). Análisis de la diversidad genética del germoplasma de teca (*Tectona grandis* L. F.) en Ecuador. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*. 5(21): 108-121.
- Nuez, F; Carrillo, J; De Ron, A. (2000). Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Ed. Nuez, F y Carrillo, J.M. Editorial de la UPV. ISBN 84-7721-945-1. 3-22.
- Park, S. (2001). Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effect of selection. PhD Thesis. University of Dublin.
- Peakall, R., & Smouse, P. (2012). Gen AlEx 6.5: Genetic Analysis in Excel. The Australian National University.
- Perrier. X, Flori. A, Bonnot. F. (2003). Data analysis methods. In: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X., Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier.pp 43 - 76.

- Proaño. E. (2007). Identificación de la calidad de sitio, utilizando el incremento medio anual en un cultivo de rebrote de Teca en la hacienda Tecal Robusta. Facultad de ingeniería mecánica y ciencias de la producción. Disponible en: <https://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/4375/1/6895.pdf>. Consultado el: 22-10-2016
- Provan, J, Powell. W, y Hollingsworth. P. (2001). Chloroplast microsatellites: new tools for studies in plant ecology and evolution. *Trends in Ecology & Evolution*, 16: 142-147.
- Rallo. P; Belaj. A. & Trujillo. I. (2002). Marcadores moleculares. Disponible en: http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayojunio_2000/almazara/almazara1.htm. Consultado el: 06 de agosto del 2016
- Rivero, J. (2004). Propiedades Físico-Mecánicas de *Gmelina arborea Roxb.* y *Tectona grandis Linn. F.* (en línea). Bo. Metodología. Consultado el 28 jun del 2005 Disponible en <http://www.monografias.com/trabajos16/gmelina-arborea/gmelina-arborea.shtml#top>
- Ryan, P.A. (1982). The management of Burmese teak forests. *Commonwealth Forestry Review*. 61(2): 115-120.
- Salazar F., Rodolfo; Albertin, Waldemar. (1974). Requerimientos edaficos y climaticos para *Tectona grandis*. Turrialba. 24(1): 66-71.
- Salhi-Hannachi. A; Khaled. C; Messaoud. M; Mohamed. M & Mokhtar. T. (2005). Comparative analysis of genetic diversity in two Tunisian collections of fig cultivars based on random amplified polymorphic DNA and inter simple sequence repeats fingerprints. *Genetic Resources and Crop Evolution* 52: 563–573. DOI 10.1007/s10722-003-6096-3
- Schuhli, G.; Paludzyszyn, E. (2010). O cenário da silvicultura de teca e perspectivas para o melhoramento genético. *Pesq. Florestal Bras. Colombo*. 30(63):217-230. Disponible: www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0123-42262013000200012. Consultado el: 09 de Noviembre del 2016
- Simpson J. 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. Méx.* 60:73-76.

- Sokal, R., & Michener, C. (1958). A statistical method for evaluating systematic relationships. *University of Kansas Science Bulletin*, 38:1409-1438.
- 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 p.
- Streets, R.J. (1962). *Exotic trees of the British Commonwealth*. Oxford, UK: Clarendon Press: 712-725.
- Tamay de Dios, L; Ibarra, C; Velasquillo, C. (2013). Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Volumen 2. Disponible en: <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>. Consultado el: 27 de Septiembre del 2016.
- Tanksley, S. (1983). Molecular markers in plant breeding. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:3-8.
- Troup, R. (1999). *The silviculture of Indian trees. Leguminosae (Caesalpinieae) to Verbenaceae*. Oxford, UK: Clarendon Press. Vol. 2.
- Valadez, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio. Distrito Federal, MX. Mundi-Prensa. 147 p.
- Verhaegen, D., Ofri, D., Fofana, I., Poitel, M., Vaillant, A. (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn. f). *Molecular Ecology Notes*, Wiley-Blackwell, 5, pp.945-947. <cirad-00845617>
- Villamón, F. (2000). Caracterización de microsátélites de *Solanum tuberosum Subsp tuberosum* y en las otras especies de papa cultivada. Tesis para optar Título de Biólogo. Facultad de Ciencias Biológicas. UNMSM. Lima-Perú.
- Wilches, A. (2004). Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura. Guatemala: Universidad Rafael Landívar, Instituto de Agricultura, Recursos Naturales y Ambiente. Serie técnica No. 15.25 p.
- Zane, L., Bargelloni, L., Patarnello, T. (2002). Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11: 1-16