

I. INTRODUCCIÓN

A. Definición del problema

A pesar de la deforestación excesiva y explotación maderera que existe actualmente en los bosques de la Ecoregión de Bosque Seco de la costa ecuatoriana, aún coexisten especies maderables valiosas pero sobreexplotadas y seriamente amenazadas (**Valverde, 1991**). Tres de estas especies semidecíduas pertenecientes a estos ecosistemas son: Amarillo de Guayaquil (*Centrolobium ochroxylum*. Rose ex Rudd), Bálsamo (*Myroxylon peruiferum* L.f.) y Moral Fino (*Maclura tinctoria* L. Steud.). (**Klitgaard et al., 1999; Herbario Loja et al., 2001; Delgado y Aguirre, 2002; Cabrera et al., 2002; Herbario Loja et al., 2003**).

Si bien existen avances significativos en las últimas décadas en cuanto a generación de tecnología e información en torno a especies forestales, en muchos países persisten grandes vacíos de conocimiento; especialmente en lo que se refiere a la estructura genética de las especies, lo que dificulta los procesos de rescate, conservación y mejora (**Cornelius, 1998**).

Es poco lo que se conoce sobre *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, más allá de sus aspectos botánicos, existiendo insuficientes estudios del estado real de conservación y variabilidad genética inter e intrapoblaciones (**Aguirre y Lars, 2005**). Los análisis genéticos por marcadores moleculares proporcionan información que contribuye a fortalecer los criterios para el estudio de poblaciones e individuos dentro de los programas de mejoramiento genético y de producción de semillas (**Namkoong y Koshy, 2001**).

A través del proceso de caracterización molecular mediante la técnica RAPD es posible determinar la variabilidad genética o plasticidad ecológica que tienen estas especies a nivel del Bosque Seco del Litoral ecuatoriano y consecuentemente en base a esto, identificar algunas características

genéticas sobresalientes que podrían ser explotados en futuros programas de mejoramiento forestal.

B. Justificación

Actualmente se desconoce la variabilidad genética que existe en las poblaciones de *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, que cohabitan en los bosques secos del Litoral ecuatoriano. La falta de investigación en aspectos moleculares alrededor de estas tres especies, ha impedido la instalación y ejecución de programas eficientes enfocados al desarrollo forestal del país.

Por tal razón, para poder generar la información científica que contribuirá a fortalecer los criterios que se presenten al momento de implementar un programa de mejoramiento genético; resulta muy necesario tener conocimiento del grado de diversidad genética que existe entre las poblaciones de: *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, las cuales fueron objeto de estudio.

En la actualidad los marcadores moleculares constituyen una herramienta de suma importancia en el mejoramiento genético forestal **(Neale y Sederroof, 1992; Iglesias y García, 1999; Ahuja, 2001)**. Las técnicas de Las técnicas de Biología Molecular y en particular el uso de Marcadores Moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés **(Phillips- Mora, 1995; Rodríguez y Fritz, 1995)**.

Considerando lo anteriormente expuesto y tomando en cuenta lo señalado por **Bucci et al., (1995) Lu et al., (1997) y Wu et al., (1999)**, quienes han resaltado de manera muy particular la utilidad que brinda la técnica del polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) en estudios genéticos de diversas especies forestales, se logró obtener de forma

eficiente una adecuada caracterización de la variabilidad genética de las tres especies en estudio.

El proceso de genotipaje con RAPDs se ha efectuado independientemente de la influencia del ambiente. De esta forma con la utilización de esta técnica de marcaje molecular se puede estimar la diversidad y relaciones genéticas que existen inter e intrapoblaciones en estas tres especies, y a partir de ello ejecutar programas orientados a la conservación y preservación de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*.

C. OBJETIVOS

1. General

- ❖ Caracterizar molecularmente las accesiones de ***C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria***, para estimar el grado de diversidad genética presente en las respectivas poblaciones del banco de germoplasma forestal de la Estación Experimental del Litoral Sur.

2. Específicos

- ❖ Determinar el nivel de variación y relación genética existente en las accesiones de ***C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria***, a través de la técnica molecular RAPD.
- ❖ Evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPDs para caracterizar el contenido genético de ***C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria***.

D. Hipótesis

- ❖ Existe variabilidad genética entre las poblaciones de ***C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*** detectada a través de marcadores moleculares.

- ❖ Los marcadores moleculares RAPDs son eficientes para la caracterización de la variabilidad genética.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

A. Especies Forestales

A.1. Amarillo de Guayaquil

A.1.1. Origen y distribución

El género *Centrolobium* comprende alrededor de 6 a 7 especies que están distribuidas en los bosques húmedos tropicales de Centro y Sudamérica. Estos bosques corresponden desde Panamá por el Pacífico hasta el noreste de Brasil, existiendo una variante genética *Centrolobium ochroxylum*. Rose ex Rudd, especie nativa del bosque tropical tropófito y montano del oeste del Ecuador que va desde el sur de Esmeraldas, Manabí, Los Ríos, (Little y Dixon, 1983) y se extiende desde la provincia del Guayas, EL Oro hasta Loja; (Ricardo Limongi, 2010, Comunicación Personal).

A.1.2. Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Sub-familia:	Lotoideae
Género:	<i>Centrolobium</i>
Especie	<i>C. ochroxylum</i> Rose ex Rudd
Nombres comunes:	Amarillo, Amarillo de Guayaquil, Amarillo lagarto claro, Balaustre.

A.1.3. Clasificación Botánica

A.1.3.1. Árbol

El árbol del Amarillo de Guayaquil generalmente es grande, alcanzando los 30 m de alto y 70 cm de diámetro a la altura del pecho en estado natural. El tronco es recto y cilíndrico, con raíces tablares angostas y una copa redondeada, hemisférica y cerrada. La corteza es de color gris claro, lisa a levemente áspera con pocas fisuras delgadas y pocas escamas. La corteza interior es verdusca. Las ramitas gruesas se encuentran ascendentes y extendidas, generalmente son verdes claras y finamente pelosas (**Little y Dixon, 1983**).

A.1.3.2. Hojas

Las hojas son compuestas, imparipinadas, alternadas con estípulas pareadas, puntiagudas de 6 mm, de color verde grisáceo o café diminutamente peludas. Las hojuelas son pareadas con pecíolos de 0.5 cm. excepto la terminal solitaria. Las láminas de las hojas miden de 6 a 20 cm. de largo y de 5 a 14 cm. de ancho y son puntiagudas al ápice y redondeadas o acorazonadas en la base. El haz es verde mate con los nervios laterales un poco impresos y el envés verde grisáceo con numerosos puntos glandulosos rojizos (**Little y Dixon, 1983**).

A.1.3.3. Flores

La inflorescencia es compuesta, el cáliz es de color pardo, de 10-17 mm con un tubo corto en forma de campana y cuatro lóbulos desiguales largos y puntiagudos. Las flores son anaranjado-amarillentas, muy vistosas, agrupadas en racimos en las puntas de las ramas, algo erectas. La corola es amarillenta con un pétalo estandarte ancho con una muesca en el ápice, dos pétalos menores alados y dos unidos formándose la quilla (**Little y Dixon, 1983**).

A.1.3.4. Fruto

El fruto del Amarillo de Guayaquil botánicamente es una sámara indehisciente cubierta con muchas espinas rectas delgadas de ± 3 cm y espinas aciculares blandas en la región de la semilla sobre el cuerpo ensanchado como bola y una ala grande. Los frutos son de color verde a café verduscos grandes, leñosos y contienen una o dos semillas. En Ecuador fructifica alrededor de septiembre **(Little y Dixon, 1983)**.

A.1.4. Importancia Socioeconómica

A.1.4.1. Madera

La madera del Amarillo de Guayaquil es dura, valiosa, tiene una albura blanquecina y el corazón oscuro, con vetas purpúreas cuando está recientemente cortada tornándose oscura. Su peso específico de $0,79 \text{ g/cm}^{-3}$, tiene grano casi recto a ondulado y textura mediana **(Little y Dixon, 1983)**.

A.1.4.2. Usos

La madera es de buena calidad, usada en carpintería en general y es durable en ebanistería de alta calidad como muebles y accesorios finos; obras interiores, en carrocerías y en construcciones navales. **(Little y Dixon, 1983)**.

A.1.5. Ecología del Amarillo de Guayaquil

El Amarillo de Guayaquil crece en bosques semidecíduos, tropicales especialmente a orillas de ríos y caminos. Esta especie es heliófita durable, con abundante regeneración natural; sus semillas son diseminadas por el viento, retoña después de haber sido cortado **(Little y Dixon, 1983)**.

A.1.6. Fenología del Amarillo de Guayaquil

Este árbol en nuestro país florece de marzo a junio y presenta sus frutos maduros de junio a septiembre **(Little y Dixon, 1983)**.

A.1.7. Sistemas Agroforestales

El Amarillo de Guayaquil es una especie de crecimiento muy rápido y de buena forma. Tiene buena salida para la industria maderera local, con mucho potencial en sistemas agroforestales. Podría utilizarse también en linderos y posiblemente como árbol disperso en potreros **(Little y Dixon, 1983)**.

A.2. Bálsamo

A.2.1. Origen y Distribución

El Bálsamo es una especie originaria de Centroamérica. Se extiende en el bosque Trópico subhúmedos desde el sur de México hasta el Amazonas en Brasil, Perú y Argentina. ***Myroxylon peruiferum L.f.*** También se encuentra distribuido en gran parte de Ecuador **(Little y Dixon, 1983)**.

A.2.2. Clasificación Taxonómica

Reino:	<i>Plantae</i>
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida (Dic.)
Orden:	Fabales
Familia:	Fabaceae
Sub-familia:	Papilionoideae
Género:	Myroxylon
Especie:	M. peruiferum L.f.
Nombres comunes:	Bálsamo, bálsamo del Perú, bálsamo de tolú, sándalo

A.2.3. Clasificación Botánica

A.2.3.1. Árbol

El Bálsamo es un árbol perennifolio muy grande, alcanzando de 30 a 35 m (hasta 40 m) de altura, con un diámetro a la altura del pecho de hasta 1 m. El tronco es derecho y cilíndrico, posee una copa redondeada a veces abierta y de follaje denso, ramas delgadas y ascendentes. La corteza externa es lisa, pardo grisácea, con abundantes lenticelas suberificadas y protuberantes, mientras la corteza interna es de color crema amarillento, granulosa, con un olor fragante peculiar. Grosor total: 10 milímetros (**Duke, 1981**).

A.2.3.2. Hojas

Las hojas del Bálsamo son dispuestas en espiral imparipinnadas, alternas, 8-20 cm de largo incluyendo el pecíolo y con hojas compuestas, 5-10 pares de folíolos alternos en el raquis, lanceolados o elípticos, agudos o acuminados, 3-11 cm de largo y 1.8-4 cm de ancho; lámina con el ápice acuminado, base

redondeada, glabras y con numerosas líneas y puntos translúcidos, el raquis 5-15 cm de largo. Poseen un olor fragante cuando se estrujan **(Duke, 1981)**.

A.2.3.3. Flores

La inflorescencia del Bálsamo se da en racimos axilares o terminales de 10 a 20 cm de largo, pubescentes; flores blancas zigomórficas; cáliz de 6 a 8 mm de largo, anchamente tubular o cupular; pétalos insertos cerca de la base del tubo del cáliz **(Duke, 1981)**.

A.2.3.4. Fruto

El fruto del Bálsamo es indehiscente (sámara) alberga a la semilla y el resto es en forma de ala. Su tamaño va de 7 a 11 cm de largo por 2 cm de ancho en el ápice, adelgazándose hacia la base; estipitado, amarillento y glabro, ápice abultado y rugoso, ala de 8 cm de largo. Las semillas de Bálsamo oscilan entre 1.5 a 1.8 cm de largo, son amarillentas con olor muy fragante **(Duke, 1981)**.

A.2.4. Importancia Socioeconómica

A.2.4.1. Madera

La madera del Bálsamo es resistente, dura, pesada, a veces muy pesada, muy aromática, con la albura de color blanco-amarillento y duramen pardo-rojizo. La madera presenta dificultad para trabajarse con máquinas y herramientas de carpintería, sin embargo se obtienen acabados muy lisos y altamente brillantes, por lo que se utiliza para aserrío, durmientes, ebanistería fina y carpintería, duela, parquet, entarimados, decoración de interiores, trabajos de tornería, moldes de fundición, carrocería e instrumentos musicales (guitarras, marimbas), muebles resistentes y de gran belleza (aunque muy pesados) **(Duke, 1981)**.

A.2.4.2. Usos

El Bálsamo a más de ser una especie arbórea que se utiliza para trabajos de ebanistería y carpintería en general, también es muy utilizado en el ámbito medicinal por sus propiedades curativas que se obtienen de la exudación (resina) de su corteza y fruto. El Bálsamo es una droga oficial de la farmacopea estadounidense y se le atribuyen las siguientes propiedades y acciones: antiséptica, antibacterial, antifúngica, anti-inflamatoria, antitusiva, cicatrizante, expectorante, respiratoria, anti disentérica, parasiticida (antihelmíntica), estomáquica, tónica, antigonorréica y antisifilítica. La resina también se utiliza para la tos, asma, catarro, bronquitis, laringitis, tuberculosis, abscesos, heridas externas, torceduras, sarna, piojos, ácaros y en tratamientos de dismenorrea, leucorrea y reumatismo. Se ha visto que el bálsamo promueve el crecimiento epitelial celular y se ha empleado para cicatrizar úlceras superficiales. **(Ohsaki, 1999)**.

A.2.5. Ecología del Bálsamo

El Bálsamo es un árbol emergente, característico de bosque primario inalterado. Posee una regeneración a veces abundante en algunas áreas, principalmente al pie del árbol madre; sin embargo necesita luz o espacios abiertos dentro del bosque para poder sobrevivir, por lo que existen muy pocos individuos en edades intermedias. Su hábitat comprende elevaciones bajas a bajo medianas, con climas subhúmedos y formaciones de bosque siempre-verde, entre los 100-600 m de elevación. Crece preferiblemente en lomas o áreas bien drenadas, con pendientes entre 20-40% y una precipitación superior a los 3000 mm anuales **(Duke, 1981)**.

A.2.6. Fenología del Bálsamo

Este árbol presenta un tipo de follaje perennifolio y florece entre marzo y mayo. Los frutos maduran de mayo a septiembre **(Duke, 1981)**.

A.2.7. Reproducción

Se reproduce por semilla. Hasta el momento no se han realizado pruebas de germinación en vivero. En algunas áreas dentro del bosque se ha observado que las semillas poseen un regular porcentaje de germinación **(Duke, 1981)**.

A.2.8. Sistemas Agroforestales

El Bálsamo es una especie forestal prometedora que podría ser utilizada en agroforestería. En algunas partes se emplea en el sistema agroforestal cafetalero de montaña. Podría utilizarse también en linderos y posiblemente como árbol disperso en potreros **(Ricardo Limongi, 2010, Comunicación Personal)**.

A.3. Moral Fino

A.3.1. Origen y Distribución

Se encuentra ampliamente distribuido por los Bosques Secos Tropicales (bs-T) y Bosques Húmedos Tropicales (bh-T) desde Cuba, Jamaica, México, Las Antillas, Guatemala, Costa Rica, Brasil, Venezuela, Ecuador, Perú hasta Bolivia. En Ecuador es común y ampliamente esparcido en los bosques secundarios, después del talado, incluyendo claros viejos y generalmente asociado con plantaciones de cacao, observado en terrazas aluviales, pero no en arcillas residuales con drenaje deficiente y mala fertilidad **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.2. Clasificación Taxonómica

Reino:	Plantae
Filo:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Urticales
Familia:	Moraceae
Sub-familia:	Lotoideae
Género:	<i>Maclura</i>
Especie	<i>M. tinctoria</i> (L.) Steud.
Nombres comunes:	Moral (Ecuador); Mora (República Dominicana); (Fustete (Cuba); Mora lisa (México); Morillo (Costa Rica); Macano (Panamá); Dinde (Colombia) Palo de Mora (Venezuela); Insira (Perú); Palu Dushi (Antillas Holandesas).

A.3.3. Clasificación Botánica

A.3.3.1. Árbol

El árbol del Moral Fino, es una especie forestal generalmente grande de hasta 40 m. de alto, alcanzando 1 m. de diámetro a la altura del pecho en estado natural. La copa es ancha, con follaje delgado en bosques con estaciones secas, es caedizo o deciduo. La corteza exterior levemente agrietada y a veces con algunas ramitas viejas espinosas. La corteza interior es anaranjada y blancuzca, verduzca arenosa y levemente amarga. Las ramitas son solitarias en los nudos, verdes cuando son tiernas y posteriormente llegan a ser grises con puntos levantados. Casi siempre se puede reconocer a este árbol al observar las raíces secundarias expuestas (**Little y Dixon, 1983**).

A.3.3.2. Hojas

Las hojas del Moral Fino son alternadas y están dispuestas, tienen peciolo de 1 cm. Las láminas delgadas son de 6 - 13 cm. de largo y 3 – 5.5 cm. de ancho, el ápice con punta larga y angosta y la base levemente redondeada, acorazonada o asimétrica. Los bordes usualmente dentados de forma irregular, los lados curvos hacia arriba, el haz es verde o verde – amarillento y el envés verde claro mate (**Little y Dixon, 1983**).

A.3.3.3. Flores

La inflorescencia del Moral Fino es dioica es decir las flores son de sexos distintos en árboles diferentes. Las numerosas flores masculinas apiñadas, están formadas por cálices diminutos, los estambres están doblados en el capullo. Las flores femeninas se apiñan formando bolas (capítulos) solitarias en los nudos. Cada flor está formada de un cáliz diminuto y pistilo con ovario de color pardo, de 10-17 mm. con un tubo corto en forma de 1 mm; estilo fino de 6 – 7 mm como hilo (**Little y Dixon, 1983**).

A.3.3.4. Fruto

El fruto del Moral Fino es tipo múltiple carnosos, esférico de forma irregular de 12 - 20 mm. de diámetro y de un color rojizo en la etapa de madurez. Es muy jugoso, dulce, comestible con los estilos filiformes persistentes, contiene muchas semillas aplanadas de 1-3 mm (**Little y Dixon, 1983**).

A.3.4. Importancia Socioeconómica

A.3.4.1. Madera

La madera del Moral Fino es dura, valiosa, tiene una albura blanquecina de 3-5 cm. de espesor. El corazón es amarillo brillante

(encendido), pero cuando es expuesto cambia en forma uniforme a rojizo o café. La madera es pesada su peso específico oscila de 0,6 - 0,7 g/cm³. La textura es de mediana a gruesa, tiene grano algo recto o entrelazado **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.4.2. Usos

La madera es excelente y es buena para toda clase de construcciones, incluyendo construcciones navales, es muy usada para laminar las chapas decorativas y aglomerados. Se ocupa para carpintería en general y es suficientemente durable para usarse en construcciones terrestres, puentes, muelles, estructuras sumergidas en agua dulce, postes y bolos. También se utiliza en ebanistería, obras interiores, vehículos, muebles y pisos. De la madera se extrae un tinte amarillento soluble en agua para producir el color kaki. La corteza se ha empleado para curtir y la exudación o resina se usa en la medicina y en calafateo de buques **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.5. Ecología del Moral Fino

El Moral Fino crece en bosques secos tropicales (bs-T) y en bosques húmedos tropicales (bh-T). Se le observa en áreas con pluviosidad marcada y continua, pero también en zonas con marcada estación seca; es una especie con tendencia heliófita, presente en condiciones de bosque secundario, en suelos de textura y acidez variable, normalmente con buen drenaje, a veces con pedregosidad elevada **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.6. Fenología del Moral Fino

La etapa de floración y fructificación del Moral Fino se da mayormente a fines de la estación seca, entre Octubre – Noviembre **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.7. Reproducción

Se reproduce por semilla. La propagación por semilla es muy exitosa en esta especie ya que posee un buen poder germinativo inicial, sin embargo, las semillas pierden la viabilidad rápidamente **(Little y Dixon, 1983)**.

A.3.8. Sistemas Agroforestales

El Moral Fino es una especie de crecimiento normal y de buena forma. Tiene buena salida para la industria maderera local, con mucho potencial en sistemas agroforestales. Se encuentra esparcido en muchas huertas tradicionales. Podría utilizarse también en linderos y posiblemente en conjunto con plantaciones de cacao **(Little y Dixon, 1983)**.

B. Estructura del ADN

El ADN está compuesto por dos cadenas o polímeros enrollados entre sí, los mismos que forman una doble hélice. Las dos cadenas no están unidas entre sí en forma covalente, sino asociadas mediante puentes de hidrógeno entre algunos átomos de las bases nitrogenadas complementarias de las dos cadenas. Este tipo de asociación entre las dos cadenas del ADN les confiere dos características fundamentales e universales. Las dos cadenas son complementarias y también antiparalelas. Se dice que las dos cadenas son complementarias porque si en una de ellas hay una base adenina (A) en cierta posición en la otra cadena, precisamente en la posición de enfrente se encuentra siempre y únicamente una timina (T). Lo mismo rige para los pares T: A, G: C y C: G. Se dice que las dos cadenas son antiparalelas porque una de las cadenas polinucleotídicas está orientada en dirección opuesta (180°) con respecto a la otra. La dirección de las cadenas es siempre un factor importante ya que la información genética que se encuentra codificada en forma lineal en el ADN también tiene orientación. A

esta orientación se da el nombre de los extremos de la molécula: de 5' - 3' o de 3' - 5' **(Balbas y Zapata, 1989)**.

La estructura del ADN es universal; en todos los organismos (salvo en algunos virus) siempre está compuesta por dos cadenas organizadas en forma de doble hélice y exhibe las propiedades mencionadas. Es precisamente esta característica universal lo que ha hecho posible el avance de la ingeniería genética molecular. Una vez definida la estructura del ADN, es posible definir el concepto de gen. El gen es el segmento de una molécula de ADN formado por un número de nucleótidos en un orden específico **(Balbas y Zapata, 1989)**.

C. Extracción de ADN

La extracción y purificación de ácidos nucleicos constituye la primera etapa de la mayoría de los estudios de biología molecular y de todas las técnicas de recombinación de ADN. Los métodos de extracción permiten obtener ácidos nucleicos purificados a partir de diversas fuentes para después realizar análisis específicos de modificaciones genéticas mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La calidad y pureza de los ácidos nucleicos son dos de los elementos importantes en este tipo de análisis. Si se desean obtener ácidos muy purificados, que no contengan contaminantes inhibidores, es preciso aplicar métodos de extracción adecuados **(Somma s-f.)**.

En lo referente a la extracción y purificación del ADN es necesario para obtener ADN de buena calidad y de esta manera poder definir la estructura física del ADN; identificación, aislamiento y mapeo de genes; ingeniería genética; y estudios filogénicos.

El aislamiento del ADN altamente polimerizado, o sea con su estructura íntegra se dificulta en algunos casos debido a que los extractos presentan una gran cantidad de sustancias como proteínas polisacáridos, taninos,

pigmentos, fenoles, quinonas, que forman complejos difíciles de separar **(Couch y Fritz 1993 citados por Phillips et al., 1995)**.

D. Electroforesis

Es una técnica empleada para separar las macromoléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz taponada (almidón, azarosa, acrilamida). La matriz funciona como un filtro, separando las moléculas en campo eléctrico, de acuerdo con el tamaño y la carga eléctrica neta que poseen. En los ácidos nucleicos, el grupo fosfato es el responsable de la carga eléctrica negativa, condiciones de pH neutro, haciendo que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo) durante la electroforesis que los separa de acuerdo al tamaño **(Ferreira y Grattapaglia 1998 citados por Peña 2007)**.

Como es bien conocido, esta técnica se basa en la capacidad de las macromoléculas cargadas para desplazarse en un campo eléctrico, con velocidad proporcional a su carga e inversamente proporcional a su tamaño. Las moléculas de ADN poseen, al pH alcalino habitual, una carga negativa uniforme por unidad de masa, lo que hace que su movilidad hacia el ánodo (+) solo venga determinada por el tamaño de la molécula (número de pares de bases, si es lineal). Debe destacarse que los cromosomas eucariotas son demasiado grandes para ser identificados por este tipo de análisis, por lo que comúnmente se aplica sobre ADN fragmentado con nucleasas **(Ortega et al., 2001)**.

El gel de electroforesis es comúnmente usado para la resolución de proteínas y ácidos nucleicos, en general macromoléculas. La composición de gel de electroforesis es semisólida, con poros abiertos de cadenas lineales relacionadas. El gel está en un molde de plancha delgada, con varios pozos para la muestra, con un campo eléctrico aplicado a través del gel y las macromoléculas cargadas de un mismo tamaño son conducidas del ánodo. **(Ramos et al., 2004)**.

E. Marcadores Moleculares

Se define como marcador molecular a todo y cualquier fenotipo molecular oriundo de la expresión de un gen, como es el caso de isoenzimas o de segmentos específicos de ADN. Los marcadores isoenzimáticos son muchas veces llamados marcadores bioquímicos. La secuencia de nucleótidos y las funciones de un marcador pueden o no ser conocidas y, por lo general, son desconocidas. Se define a un marcador molecular como un marcador genético **(Ferreira y Grattapaglia, 1998)**.

Es el análisis molecular de la variabilidad del ADN el que permite determinar puntos de referencia en los cromosomas, conocidos como “marcadores moleculares”. Esto se define como cualquier fenotipo molecular proveniente de un gen expresado o bien de un segmento específico de ADN, que representan regiones expresadas o no del genoma **(Canchignia, 2007)**

E.1. Importancia de los Marcadores Moleculares

Todos los organismos están sujetos a presentar mutaciones como resultado de las funciones normales de las células o por interacciones con el medio, incluyendo enfermedades, parásitos, competidores, contaminación, cambios climáticos. Como consecuencia, van surgiendo diferencias entre individuos, lo que a nivel molecular repercute en una variación génica o polimorfismo **(Frankham, 2003)**.

Muchas de estas mutaciones se localizan en las partes no funcionales del genoma, es decir, no pueden ser reveladas por la secuenciación de la proteína codificada, por lo que tienen que ser reveladas como marcadores moleculares, más que como isoformas de la proteína. Los buenos marcadores son aquellos que, en la misma región del genoma, muestran variación entre organismos vegetales de la misma especie. Esto permite determinar diversidad entre familias y poblaciones; establecer líneas de pedigrí; servir como base para la identificación de especies, híbridos y recursos genéticos; establecer paternidad y realizar

el mapeo genómico aplicable en genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular y genética conservacionista, entre otros (**Liu y Cordes, 2004**).

E.2. Tipos de Marcadores Moleculares

Existen varias técnicas para definir marcadores moleculares y detectar polimorfismo pero ninguna de ellas es ideal. Por ello, se debe tomar en cuenta la finalidad y la resolución genética deseada, así como los costos antes de elegir una técnica (**Mueller y Wolfenbargen, 1999**). Los autores mencionados indican que entre las técnicas más utilizadas en la última década están los micros satélites o SSR (Simple Sequence Repeat), la técnica del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción o RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphism), las amplificaciones al azar de ADN polimórfico o RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) y el polimorfismo de largo del fragmento amplificado o AFLP.

E.2.1. Microsatélites o SSR.

Los Microsatélites son repeticiones de secuencias nucleotídicas cortas, no codificantes y al variar el número de repeticiones dan origen a variantes (Alelos) dentro de una población. Los microsatélites han sido utilizados, ya que son muy informativos y, como son heredados en forma mendeliana, son capaces de seguir la segregación de locis genéticos multialélicos. Los microsatélites han sido empleados en estudios de mapeo, genética de poblaciones y pruebas de paternidad. Sin embargo, el desarrollo de marcadores microsatélites es un proceso costoso basado en secuenciación y diseño de primers específicos para cada locus. Además, se requiere tener información, generalmente la secuencia completa, de la región genómica donde se localiza el microsatélite (**Montaño et al., 2006**).

E.2.2. Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción (RFLP)

Los marcadores RFLP se obtienen al digerir el ADN (Genómico o mitocondrial) con enzimas de restricción, las cuales cortan en sitios con una secuencia específica. Si existen modificaciones en la secuencia del ADN se apreciarán cambios en el número y tamaño de los fragmentos generados, como resultado de la desaparición o aparición de nuevos sitios de corte. La presencia y tamaño de los fragmentos se puede determinar por hibridación con una zona (PROBE) marcada o amplificando la región de interés por PCR utilizando Primers específicos (**Dodgson, Cheng y Okimoto; 1997, Klimbunga et al., 2001**).

E.2.3. ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Esta técnica fue desarrollada independientemente por dos grupos en Estados Unidos. **Williams et al; (1990)**, describieron una técnica en el contexto del análisis mendeliano, demostrando la identificación de marcadores genéticos para mapeamiento; la patentaron con el nombre de RAPD o "Random Amplified Polymorphic DNA" (ADN polimórfico amplificado al azar). **Welsh & McClelland; (1990)** a su vez propusieron la denominación más apropiada para la técnica, llamándola AP-PCR ó "Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction" ó Amplificación al azar de la reacción en cadena de la polimerasa (**Ferreira y Grattapaglia, 1998**).

La modificación de la técnica PCR que dio origen al RAPD se logró al sustituir el uso de un par de oligonucleótidos ("Primers", iniciadores o cebadores) largos, por un solo "primer" corto y con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes. El producto de esa unión pueden ser bandas polimórficas cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (**Becerra y Paredes, 2000**), pero si existen diferencias en una o ambas hebras

donde deben insertarse los cebadores se da como resultado la no amplificación de la banda **(López, 1999)**.

La técnica de los RAPD, como ya se ha mencionado, se basa en una modificación de la técnica de la PCR. La PCR permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas. Pequeños oligonucleótidos, con homología a las secuencias flanqueantes, son utilizados como iniciadores por la polimerización del ADN de la región de interés **(Mendoza-Herrera y Simpson, 1997)**. Los cebadores o “primers” RAPDs son 29 capaces de hibridar a cientos de sitios en el ADN, sin embargo no todas las hibridaciones conllevan a la amplificación de un fragmento. Para que esto ocurra es necesario que el cebador se acople a dos sitios en cadenas opuestas del ADN, cercanos dentro de 2 kb de cada una, que es el tamaño máximo de un fragmento de PCR. Cuando estas condiciones existen se produce una amplificación exponencial y se genera un fragmento. Los fragmentos amplificados provienen generalmente de diferentes regiones del genoma por lo que se pueden examinar múltiples *loci* rápidamente. El poder de ésta técnica se pone de manifiesto cuando se utiliza para identificar variaciones en la secuencia de ADN entre individuos. Esos cambios en la secuencia producen un patrón diferente de fragmentos amplificados, los cuales son separados en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta **(Cornide, 2000)**.

RAPD's, son marcadores dominantes, o sea, que la aparición de una banda implica que existe una homología con el cebador, todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el cebador no se amplifican. La naturaleza de los fragmentos amplificados está fuertemente influenciada por las secuencias del ADN del organismo en estudio y las del oligonucleótido **(Williams et al., 1990)**, y de las condiciones de la reacción **(Becerra y Paredes, 2000)**.

Los resultados de RAPD's obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 loci por "primer"), su potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (**Becerra y Paredes, 2000**).

Según **Williams et al., (1990)**; **Phillips- Mora et al., (1995)**; **López, (1999)**; **Arguedas, (2001)** el análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos para llevarse a cabo, los cuales salvo en lo que se refiere a los iniciadores, son los mismos elementos necesarios para la PCR:

- ❖ **ADN molde:** es el ADN de cadena doble proveniente del organismo que se quiere analizar. La concentración óptima de ADN sugerida por **por Weising et al., (1995)**, es de 10-50 ng por 50 µl de reacción.
- ❖ **"Primer" o cebador:** oligonucleótido o segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos, usualmente 10 en el caso de RAPD's y deben tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente, con la propiedad de localizarse y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Para la mayoría de las plantas los "primers" pueden generar de 2-10 productos de amplificación.
- ❖ **Desoxinucleótidos:** se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y dTTP para la síntesis de la cadena.
- ❖ **Solución "tampón":** las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada a un pH de 8,4.
- ❖ **Taq-polimerasa:** es la enzima ADN-polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (**Erlich, 1989**). Esta

enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado fijado en este caso por el "primer". Según **Ferreira y Grattapaglia, (1998)**, la cantidad óptima de Taq polimerasa, para el ensayo RAPD es de una unidad por reacción. Concentraciones superiores en general resultan en el aumento de amplificaciones no específicas y por lo tanto perfiles de bandas con arrastre o bandas superpuestas muy intensas.

Durante todo el análisis RAPD's se da una serie de reacciones químicas en forma cíclica, las cuales involucran tres fases que son definidas por cambios en la temperatura (**Innis et al., 1990**)

- ❖ Desnaturalización del ADN que ocurre entre 93-95° C. En este momento las dos cadenas se separan y permanecen en suspensión hasta que la temperatura se reduce.
- ❖ Unión con el "primer" a 35° C, en sitios complementarios de la cadena disociada.
- ❖ Síntesis del segmento complementario de la cadena en una dirección específica (5' a 3') a partir de la unión del "primer" de reacción. Se produce mediante la acción de la polimerasa y la presencia de desoxinucleótidos libres en la solución y otros elementos minerales como el magnesio y el potasio. Esta fase se produce a 72 grados centígrados.

Estas tres fases constituyen el ciclo completo de amplificación el cual se repite entre 40 y 50 veces bajo condiciones que semejan a las que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), logrando la amplificación exponencial de varios fragmentos de ADN (**Innis et al., 1990**). Estos fragmentos sintetizados son los marcadores RAPD's y se visualizan al someter a electroforesis en un gel de

agarosa las muestras de ADN coloreadas con bromuro de etidio para ser visualizadas con la ayuda de luz ultravioleta (**Williams et al., 1990**).

E.2.3.1. Ventajas y desventajas de la técnica RAPD's

Las principales ventajas de la técnica de RAPD's son la rapidez en la obtención de resultados, el costo reducido, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos, la cantidad reducida de ADN requerida (**Becerra y Paredes, 2000**), no requiere desarrollo previo de una biblioteca de sondas específicas para el organismo de interés, permite detectar el gran polimorfismo de ADN distribuido por todo el genoma de estudio (**Ferreira y Grattapaglia, 1998**). En definitiva la técnica de RAPD's es una técnica simple que no requiere un conocimiento previo del genoma, es relativamente barata y ha tenido muchas aplicaciones (**Chong et al., 2000**).

Una de las principales limitaciones de la técnica es el bajo contenido de información genética por locus, ya que solo un alelo es detectado al ser amplificado, a excepción de los alelos codominantes resultantes de pequeñas inserciones o deleciones en el locus RAPD (**Ferreira y Grattapaglia, 1998**). Otra limitación es la inconsistencia de los datos debido a diferentes condiciones de laboratorio, lo que produce pequeñas alteraciones en los patrones de amplificación que pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes (**Becerra y Paredes, 2000**).

E.2.4. Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados o AFLP.

Los marcadores AFLP aparecen como una nueva estrategia para la generación de marcadores moleculares relativamente baratos, sencillos, rápidos y confiables. Por ello, se han convertido en las herramientas moleculares más adecuadas para establecer la huella génica de cualquier origen o complejidad, analizando simultáneamente muchos locis y detectando un mayor número de marcadores de ADN polimórfico que cualquier otro medio basado en la PCR. La técnica de AFLP detecta los cambios de tamaño de las distintas regiones o loci en el genoma y no se requiere conocer la secuencia de este. Debido a que estos marcadores se generan en condiciones de alta selectividad (Astringencia) es menos probable que se presenten falsos positivos, como los generados frecuentemente por RAPD – PCR, por ejemplo. Básicamente la técnica consta de la digestión parcial del ADN utilizando enzimas de restricción. A los fragmentos se le une en cada extremo adaptadores complementarios y posteriormente se amplifican por PCR y los productos son separados por tamaño utilizando electroforesis (**Montaño et al., 2006**).

Por ello, la técnica AFLP ha encontrado mucha aplicación en el monitoreo de heredabilidad de características deseables tanto en plantas como en animales, diagnóstico de enfermedades hereditarias, análisis de pedigríes, tipificación forense, análisis de paternidad, monitoreo de poblaciones silvestres, identificación de familias, medición de variabilidad genética, construcción de mapas genéticos (Localización de genes en los cromosomas), búsqueda de marcadores de ADN ligados a rasgos genéticos y tipificación microbiana, entre otros. La única desventaja de AFLP es la dificultad que tiene para discernir co-dominancia. Es decir, un locus homocigoto (AA) y uno heterocigoto (Aa) pueden verse iguales, ya que A es amplificado y se observa una banda en ambos casos. Para poder distinguirlo se

requiere un equipo altamente sensible y software especializado (**Moen et al., 2004**).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

A. Localización de la Investigación

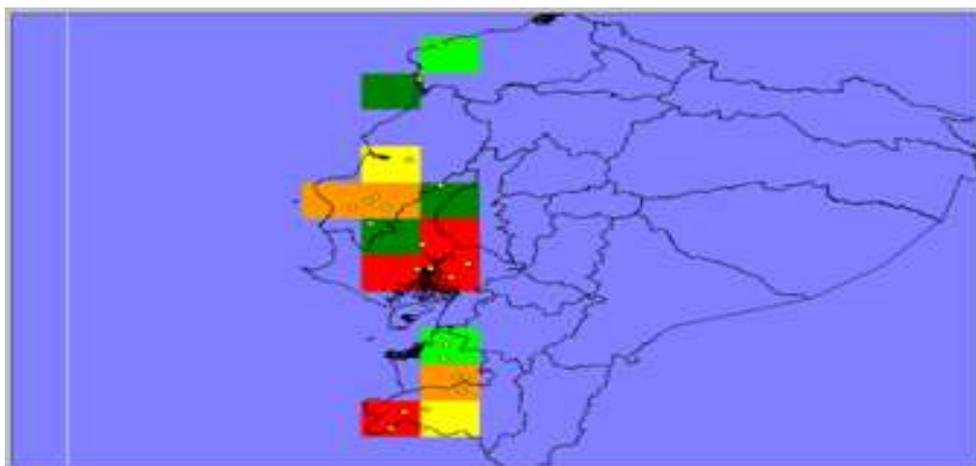
La presente investigación tuvo sede en la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) del INIAP, donde se mantienen los genotipos de las especies forestales producto de las recolecciones efectuadas por el Programa de Forestería durante los años 2007-2008. La Estación Experimental está ubicada en el Km 26, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas. La extracción de ADN se efectuó en los Laboratorios de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo ubicada en el Km. 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas, en la provincia de Los Ríos y El Laboratorio de Biotecnología de la EELS (INIAP). Finalmente se efectuó el genotipaje de las accesiones de *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP ubicado en la Panamericana Sur km 1, Vía Tambillo, Sector Cutuglagua, en la provincia de Pichincha.

B. Materiales y Equipos

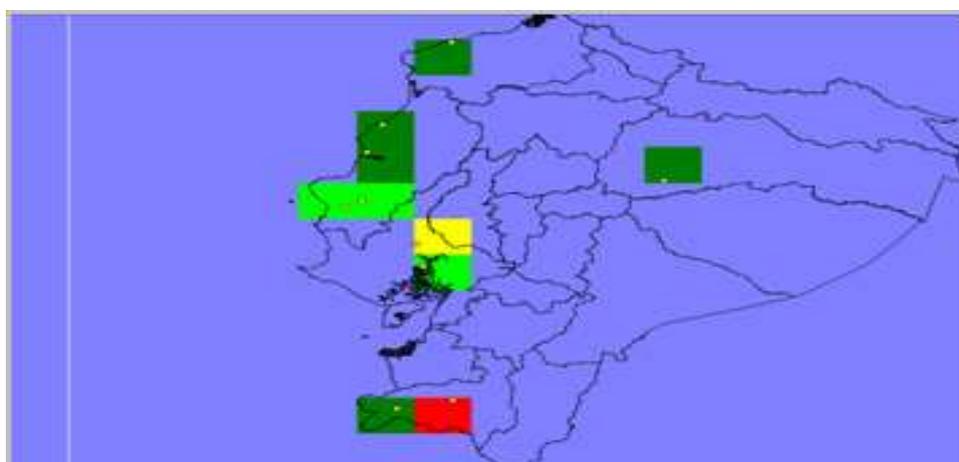
B.1. Material experimental

El material genético provino del Banco de germoplasma de especies forestales del Programa de Forestería de las Estaciones Experimentales Litoral Sur y Portoviejo (EEPO), cuya procedencia son las provincias de Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos y Manabí (**Figura1**). Para la caracterización molecular se utilizaron 71 accesiones de *C. ochroxylum*, 24 accesiones de *M. peruiferum* y 21 accesiones de *M.tinctoria* (**Cuadros 1, 2 y 3**).

AMARILLO DE GUAYAQUIL



BÁLSAMO



MORAL FINO

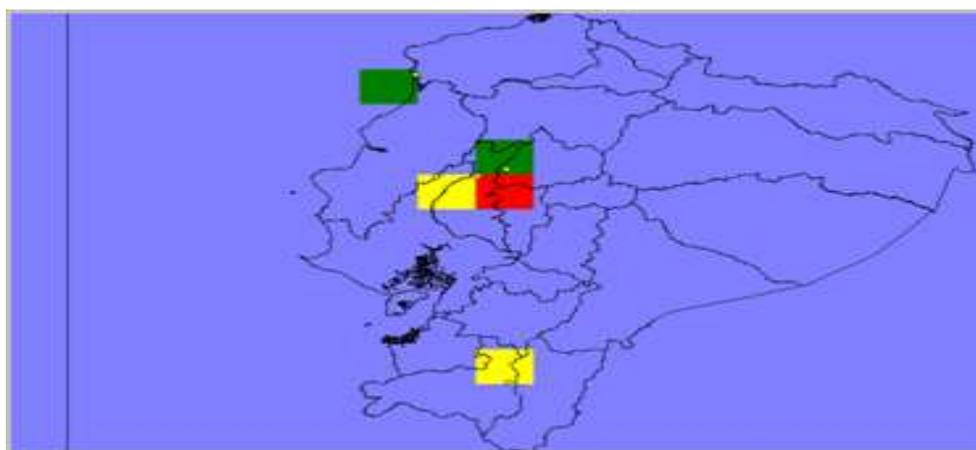


Figura 1. Distribución de Amarillo de Guayaquil, Bálsamo y Moral Fino a nivel del Litoral ecuatoriano¹.

¹ Figura tomada de Informe Anual 2008-2009 del Programa de Forestería de la EELS, INIAP. 2010

Cuadro 1. Códigos, sitios y provincias de recolección de las accesiones de *C. ochroxylum*, existentes en la EELS y EEPO. Las cuales se utilizaron para la caracterización molecular.

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
A1	GCBCOP101	CERRO BLANCO	GUAYAS
A2	GCBCOP104	CERRO BLANCO	GUAYAS
A3	GCBCOP202	CERRO BLANCO	GUAYAS
A4	GCBCOP204	CERRO BLANCO	GUAYAS
A5	GCBCOP207	CERRO BLANCO	GUAYAS
A6	GCBCOP2010	CERRO BLANCO	GUAYAS
A7	GJUCOP303	JUJAN	GUAYAS
A8	GJUCOP304	JUJAN	GUAYAS
A9	GJUCOP309	JUJAN	GUAYAS
A10	GPECOP403	PETRILLO	GUAYAS
A11	GPECOP405	PETRILLO	GUAYAS
A12	GPECOP411	PETRILLO	GUAYAS
A13	GMCHCOP503	MANGLARES CHURUTE	GUAYAS
A14	GMCHCOP504	MANGLARES CHURUTE	GUAYAS
A15	GMCHCOP510	MANGLARES CHURUTE	GUAYAS
A16	GPECOP602	PETRILLO	GUAYAS
A17	GPECOP607	PETRILLO	GUAYAS
A18	GBOCOP701	BOLICHE	GUAYAS
A19	GBOCOP703	BOLICHE	GUAYAS
A20	MJICOP2201	JIPIJAPA	MANABI
A21	MJICOP2209	JIPIJAPA	MANABI
A22	MPPGCOP2108	PEDRO PABLO GÓMEZ	MANABI
A23	MPPGCOP2109	PEDRO PABLO GÓMEZ	MANABI
A24	MPPGCOP2110	PEDRO PABLO GÓMEZ	MANABI
A25	MJICOP2211	JIPIJAPA	MANABI
A26	MLSGCOP2404	LA SEGUA	MANABI
A27	MLSGCOP2408	LA SEGUA	MANABI
A28	MLSGCOP2411	LA SEGUA	MANABI
A29	MLSGCOP2413	LA SEGUA	MANABI
A30	MSIPCOP2504	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI

Continúa cuadro 1...

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
A31	MSIPCOP2509	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI
A32	MSIPCOP2511	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI
A33	MSAOCOP2301	SANTA ANA	MANABI
A34	MSAOCOP2303	SANTA ANA	MANABI
A35	LMACOP1002	MACARA	LOJA
A36	LMACOP1004	MACARA	LOJA
A37	EOPÑCOP6105	PIÑAS	EL ORO
A38	EOPÑGCOP6402	PIÑAS GERRA	EL ORO
A39	EOPÑGCOP6403	PIÑAS GERRA	EL ORO
A40	EOPYCOP101	PUYANGO	EL ORO
A41	EOPYCOP104	PUYANGO	EL ORO
A42	EOLVCOP6701	LA VICTORIA	EL ORO
A43	EOZRM COP6501	ZARUMA	EL ORO
A44	EECOP9101	SAME	ESMERALDA
A45	EECOP9102	SAME	ESMERALDA
A46	EECOP9105	SAME	ESMERALDA
A47	EOEGCOP6301	EL GUABO	EL ORO
A48	MCBCOP2804	ZAPOTILLO	MANABI
A49	EOPÑCOP6206	PIÑAS	EL ORO
A50	GCBCOP114	CERRO BLANCO	GUAYAS
A51	MCBCOP2801	ZAPOTILLO	MANABI
A52	MPCHCOP2901	PICHINCHA	MANABI
A53	LPINCOP4414	PINDAL	LOJA
A54	LZACOP4406	ZAPOTILLO	LOJA
A55	LMACOP4104	MACARA	LOJA
A56	LMACOP4105	MACARA	LOJA
A57	LCECOP4701	CELICA	LOJA
A58	LZACOP4407	ZAPOTILLO	LOJA
A59	LPINCOP4411	PINDAL	LOJA
A60	EOLVCOP6702	LA VICTORIA	EL ORO

Continúa cuadro 1...

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
A61	EOLVCOP6703	LA VICTORIA	EL ORO
A62	EOPÑCOP202	PIÑAS	EL ORO
A63	MPTCOP103	PORTOVIEJO	MANABI
A64	LPINCOP4412	PINDAL	LOJA
A65	LPINCOP4413	PINDAL	LOJA
A66	LMACOP4111	MACARA	LOJA
A67	LMACOP4112	MACARA	LOJA
A68	LCECOP4702	CELICA	LOJA
A69	MCMOCOP3001	CHONE	MANABI
A70	MPBGCOP2604	PAJAN	MANABI
A71	EOPÑCOP204	PIÑAS	EL ORO
A72	EECOP9104	SAME	ESMERALDA
A73	EECOP9106	SAME	ESMERALDA
A74	EECOP9103	SAME	ESMERALDA
A75	LMACOP4106	MACARA	LOJA

Cuadro 2. Códigos, sitios y provincias de recolección de las accesiones de *M. peruiferum*, existentes en la EELS y EEPO. Las cuales se utilizaron para la caracterización molecular.

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
B1	AMZMPP101	AMAZONÍA	AMAZONIA
B2	GCBMPP201	CERRO BLANCO	GUAYAS
B3	GPEMPP101	PETRILLO	GUAYAS
B4	GPEMPP106	PETRILLO	GUAYAS
B5	GPEMPP107	PETRILLO	GUAYAS
B6	GCBMPP204	CERRO BLANCO	GUAYAS
B7	MCHCMPP2102	CHONGON COLONCHE	MANABI

Continúa cuadro 2...

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
B8	MCHCMPP2104	CHONGON COLONCHE	MANABI
B9	MSIPMPP2201	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI
B10	MLCMPP2301	LAS CORONAS	MANABI
B11	MLCMPP2303	LAS CORONAS	MANABI
B12	LPCMPP4101	PALTA	LOJA
B13	LCTMPP4801	CATACocha	LOJA
B14	LCTMPP4802	CATACocha	LOJA
B15	LCTMPP4804	CATACocha	LOJA
B16	LSGMPP4901	SANGONOMÁ	LOJA
B17	LCTMPP5001	CATACocha	LOJA
B18	EEMPP101	ESMERALDA	ESMERALDA
B19	MLCMPP2304	LAS CORONAS	MANABI
B20	LSGMPP4902	SANGONOMÁ	LOJA
B21	MCHCMPP2101	CHONGON COLONCHE	MANABI
B22	GPEMPP102	PETRILLO	GUAYAS
B23	MSIPMPP2204	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI
B24	MSVMPP3001	CATACocha	LOJA

Cuadro 3. Códigos, sitios y provincias de recolección de las accesiones de *M. tinctoria* existentes en la EELS y EEPO. Las cuales se utilizaron para la caracterización molecular.

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
M1	MPCHMTP2101	PICHINCHA	MANABI
M2	MPCHMTP2104	PICHINCHA	MANABI
M3	MPCHMTP2105	PICHINCHA	MANABI
M4	MPCHMTP2103	PICHINCHA	MANABI
M5	MPCHMTP2106	PICHINCHA	MANABI

Continua cuadro 3...

CÓDIGO ADN	ACCESIÓN	SITIO DE RECOLECCIÓN	PROCEDENCIA
M6	MPCHMTP2107	PICHINCHA	MANABI
M7	MPCHMTP2108	PICHINCHA	MANABI
M8	MSIPMTP2501	S. ISIDRO PEDERNALES	MANABI
M9	MJUMTP2601	EL CARMEN	MANABI
M10	LPMMTP4104	PALOMONTON	LOJA
M11	LPMMTP4105	PALOMONTON	LOJA
M12	LPMMTP4106	PALOMONTON	LOJA
M13	LGIMTP4207	GIUNUMA	LOJA
M14	LRLEMTP8101	LA ESPERANZA	LOS RÍOS
M15	LRLEMTP8102	LA ESPERANZA	LOS RIOS
M16	LRLEMTP8103	LA ESPERANZA	LOS RÍOS
M17	LRLEMTP8104	LA ESPERANZA	LOS RIOS
M18	LRLEMTP8105	LA ESPERANZA	LOS RÍOS
M19	LRPPMTP8201	LOS RIOS	LOS RIOS
M20	LRPPMTP8202	LOS RÍOS	LOS RÍOS
M21	CLMMTP10101	L A MANA	COTOPAXI

B.2. Materiales de Laboratorio

En el **Cuadro 4** se presenta los materiales, equipos y reactivos que se utilizaron en la presente investigación.

Cuadro 4. Materiales de Laboratorio, Equipos y reactivos utilizados en las Pruebas Moleculares de las especies en estudio.

<i>EQUIPOS</i>	<i>MATERIALES</i>	<i>REACTIVOS</i>	
Balanza 0.001 g.	Tubos de ensayo 15 ml	Tris EDTA	L- ascorbic Acid (Vit C)
Cámara fotográfica	Vasos de precipitación	Proteinasa K	2- Mercaptoetanol (100x) liquid
UV tras iluminador 20 x 20	Matraces	Etanol 100 %	Cloroformo Isoamilalcohol (24:1)
Baño de maría	Frascos	LN2 líquido	Isopropanol
Ultra centrífuga	Mortero	Agua ultra pura (DNA free)	Agarosa ultrapure
Congelador horizontal -20 °C	Espátula	Cloruro de sodio	Buffer PCR
Vortex	Bisturí	Cloruro de Magnesio	Cloruro de magnesio
Peachimetro	Tijeras	EDTA	DNTPS set 4 x 25 u mol
Refrigeradora	Hielera	RNAsa	Primers OPERON
Bandejas de electroforesis horizontal	Tanque de N ₂ líquido	CTAB	Taq DNA polimerasa
Termociclador	Freezer -20 °C	Bromuro de etidio	TAE 1X
Micropipetas	Micro pipetas	Tris HCL	DNA Low Mass Ladder 100 bp
Fuente de poder	Tubos eppendorf 1.5 ml	Tris base	Metabisulfito de sodio

C. Manejo del Experimento

C.1. Recolección de Material Vegetal

Se recolectaron muestras foliares (100g) en estado tierno de acuerdo a lo propuesto por **Ferreira y Grattapaglia (1998)**, quienes mencionan que el tejido tierno recogido en la fase activa de crecimiento de las plantas, proporcionan frecuentemente los mejores resultados en la extracción de ADN.

Posteriormente una parte de las muestras colectadas fueron cuidadosamente conservadas en tubos eppendorf 1.5 ml que contenían 200 μ l aproximadamente de solución CTAB y acondicionadas en una hielera con una temperatura aproximada de 5-7°C. La otra parte de las muestras fueron colocadas en fundas zip lock, las mismas que contenían silica gel (100 g) debidamente etiquetadas y transportadas al laboratorio.

C.2. Extracción de ADN

Por no disponer suficiente información sobre la efectividad de métodos de extracción de ADN en especies forestales. Tres protocolos de extracción de ADN genómico de plantas fueron empleados a manera de exploratorios: **1. Colombo Second y Charrier, (1998), Apéndice 3 2. Doyle & Doyle (1990), Apéndice 4. Kit Comercial PureLink Plant Total DNA Purification (INVITROGEN Catálogo N° K1830-01).**

Evaluándose comparativamente la eficiencia cualitativa y cuantitativa de los mencionados protocolos de aislamiento de ADN.

Basados en los resultados de las pruebas preliminares de extracción de ADN, se estableció el protocolo de extracción con el que se obtuvo la mayor cantidad de ADN genómico que en este caso fue el Kit comercial: *PureLink Plant Total DNA Purification*.

Utilizando este Kit de extracción se macera 100 mg de tejido vegetal por muestra, a la cual se añadió 250 µl de buffer de resuspensión y se homogenizó el tejido. Se añadió 15 µl de 20% SDS y 15 µl RNase A (20 mg/ml). El lisado obtenido se incubó a 55°C por 20 minutos y se centrifugó a 13000 rpm para remover material insoluble. El sobrenadante claro se transfirió a un tubo estéril de 1,5 ml, sin alterar el pellet. Luego se añadieron 100 µl de buffer de precipitación a cada muestra y se incubó para ser incubado en hielo por 5 minutos. Posteriormente, se centrifugó a máxima velocidad por 5 minutos y se añadieron 375 µl de Binding Buffer (B4) a 250 µl del lisado. Esta mezcla, adecuadamente homogeneizada, se transfirió a una columna de purificación (*Purelink Spin Cartridge*) y se procedió a los lavados respectivos según el manual del kit. Finalmente se procedió a la dilución del ADN añadiendo 100 µl de Elution Buffer (E1). **Apéndice 2.** El ADN obtenido se conservó en refrigeración hasta su cuantificación.



Figura 2. Kit Comercial PureLink Plant Total DNA Purification

C.3. Cuantificación de ADN

Para determinar la integridad y concentración de las muestras de ADN de Amarillo, Bálsamo y Moral Fino, se dio un punto de vortex y centrifuga, las muestras fueron analizadas mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,0% en tampón TAE 1X. Para depositar las muestras en los geles se mezcla 2 µl de blue juice, 1 µl de ADN y 9 µl de agua destilada y se los coloca en los pozos con la ayuda de una pipeta. La

corrida de los geles se realizó en la cámara electroforética marca Labnet Gel XL Ultra V-2 a un voltaje de 100 v durante una hora y media. Después se tiñeron los geles en una solución de bromuro de etidio con ayuda de un agitador marca Labnet Reciprocal-30 durante 15 minutos. Posteriormente fueron visualizados y cuantificados comparativamente utilizando un marcador de talla estándar *Low Mass Ladder* 100 bp. (10068-013; Invitrogen), en el fotodocumetador UV marca Dolphin View. Para la determinación eficiente de la concentración de las muestras se empleó un fluorímetro Qubit-it analizado con el kit de ensayo dsDNA BR (rango de 2-1000 ng) (INVITROGEN Cat. N° Q32850). El rendimiento de ADN se detalla en el **Apéndice 5,6,7**. Sobre las bases de estas determinaciones, la concentración de ADN de cada una de las accesiones se estandarizó en tampón TE 0,1 M Tartrazine hasta lograr una concentración final de 5 ng/μl.

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

C.4 Validación de la calidad de ADN a través su amplificación por RAPDs.

Una vez extraído y cuantificado el ADN se procedió a su validación a través de la amplificación de las muestras diluídas con iniciadores aleatorios, utilizando 7 μl de mezcla de reacción constituida por Buffer 5X (500 mM TRIS pH=8,5, 10 mM KCl, 2mM MgCl₂, 500 mg/ml BSA, 0.01% xylene cyanole, 1.5% Ficoll 400), 1μM de dNTPS, 1μM de primer, 0,6 U de Taq y 5 ng/ul de ADN.

Se realizó un prescreening con 12 primers RAPDs OPERON para determinar su amplificación, puesto que no se conocía la secuencia que podría presentar los ADN's en análisis.

La amplificación fue realizada en un Termociclador marca MJ Research PTC 100, empleando un ciclo de desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min, seguido de 45 ciclos de amplificación a 94 °C por 1 min, 36

°C por 30 seg, y 72 °C por 2 min, y un ciclo final de extensión a 72 °C por 7 min.

La separación de los productos de PCR se realizó en geles de agarosa 1,5% corridos por 90 minutos a 100 V, teñidos en Bromuro de Etídio y visualizados en el fotodocumentador UV marca Dolphin View.

La calidad del ADN fue validada a través de su amplificación, siendo consistentemente amplificable en los tres materiales forestales a través de la técnica de RAPD utilizando los primers OPERON OPR-07, OPR-20, lo cual se muestra en la **Figura 3**.

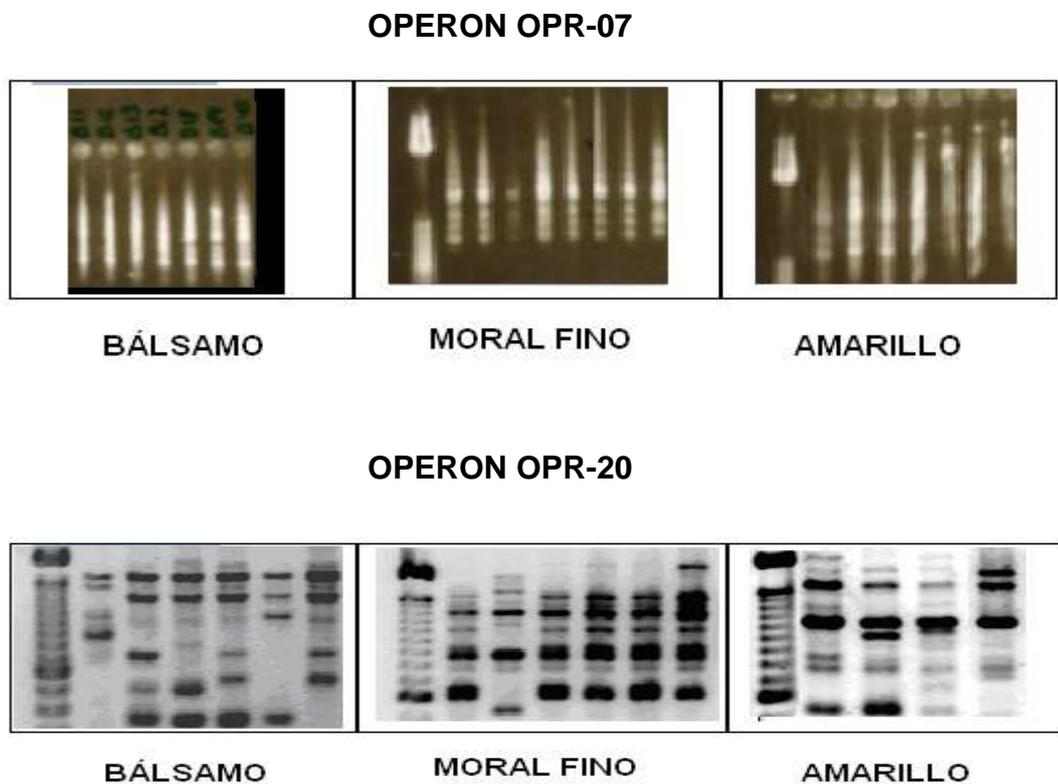


Figura 3. Validación de la calidad de ADN a través su amplificación con RAPDs

C.5. Selección de la combinación de “Primers” para RAPDs.

Una vez validado el ADN de los forestales se evaluaron en un sondeo preliminar (screening), 24 primers de *Operon Technologies* para

la caracterización molecular de *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*. Como resultado del proceso de screening se seleccionaron para realizar el genotipaje con todas las muestras en estudio, a aquellos partidores (**Cuadro 5, 6 y 7**) que revelaron polimorfismos claros, consistentes, informativos y repetitivos, siempre y cuando estas bandas polimórficas no correspondan a los extremos del perfil.

Las secuencias de cada uno de los primers OPERON utilizados en el estudio de las especies forestales, se exponen a continuación:

Cuadro 5. Secuencia de los primers seleccionados, con mayor polimorfismo registrado en *C. ochroxylum*. EELS, INIAP, 2010.

AMARILLO

PRIMER OPERON	SECUENCIA 5'-3'
OPAN-16	AAGCGACCTG
OPS-01	CTACTGCGCT
OPAN-09	GGGGGAGATG
OPW-17	GTCCTGGGTT
OPS-16	AGGGGGTTCC
OPS-15	CAGTTCACGG
OPS-04	CACCCCCTTG

Cuadro 6. Secuencia de los primers seleccionados, con mayor polimorfismo registrado en *M. tinctoria*. EELS, INIAP, 2010.

MORAL FINO

PRIMER OPERON	SECUENCIA 5'-3'
OPAC-01	TCCCAGCAGA
OPA-19	CAAACGTCGG
OPR-07	ACTGGCCTGA
OPM-09	GTCTTGCGGA
OPAA-09	AGATGGGCAG
OPW-12	TGGGCAGAAG
OPAA-13	GAGCGTCGCT

Cuadro 7. Secuencia de los primers seleccionados, con mayor polimorfismo registrado en *M. peruiferum*. EELS, INIAP, 2010.

BÁLSAMO

PRIMER OPERON	SECUENCIA 5'-3'
OPS-19	GAGTCAGCAG
OPAA-01	AGACGGCTCC
OPS-08	TTCAGGGTGG
OPR-07	ACTGGCCTGA
OPA-19	CAAACGTCGG
OPN-17	CATTGGGGAG
OPM-04	GGCGGTTGTC

C.6. Amplificación de marcadores RAPDs

Las amplificaciones finales se realizaron colocando en cada tubo de reacción una alícuota de los siguientes componentes:

3ul de cada ADN muestra (5ng/ul) en tubos PCR. En cada uno de ellos se adicionó 5,5ul de la solución del mix de reacción la misma que estuvo compuesta de: 2,2ul Buffer PCR 5X, cuyos reactivos fueron: (Tris pH8 0,25M; KCl 0,1M; MgCl₂6H₂O 0,005M; BSA 0,25%; Ficoll400 0,75%; Xylene Cyanole 0,05%) (Morillo, 2000), 0,13ul de Taq polimerasa (5U/ul), 0,4ul de DNTPs (2,5mM c/u; MgCl 0,025M), 2,3ul de agua ultrapura y 0,4ul del primer (20pM). La mezcla resultante se cubrió con 10ul de aceite mineral, para evitar la evaporación de los compuestos. Finalmente los tubos fueron debidamente cubiertos y colocados en un termociclador MJ Research PTC-100 con la siguiente programación:

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
1. Desnaturalización inicial	94	5
2. Desnaturalización cíclica	94	0,5
3. Alineamiento	40	1
4. Extensión	72	2
5. 40 veces desde el 2 hasta el 4		
6. Extensión final	72	7
7. Conservación de la muestra	4	5

Los productos de la amplificación se analizaron por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% elaborados con buffer tampón TAE 1X y bromuro de etidio (0,5 ug/ml).

La electroforesis se llevó a cabo durante 3 horas a 110 Voltios. Se usó la escalera de peso molecular de peso conocido (100 bp Ladder) como marcador de referencia. Luego, las bandas de ADN fueron visualizadas bajo luz ultravioletas en un fotodocumentador UV marca Dolphin View e impresas en papel térmico, en una impresora térmica

marca Sony, para la posterior identificación y lectura de las bandas polimórficas.

C.7. Registro de polimorfismos

El registro de bandas se realizó por inspección visual de los productos de amplificación RAPDs. Las bandas fueron consideradas como polimórficas si estas se encontraban presentes o ausentes entre genotipos. La presencia de un polimorfismo se codificó con “1” y la ausencia con “0”. Únicamente se registraron bandas que no presten a la ambigüedad en la lectura. Para las bandas registradas, su peso molecular en pares de bases fue estimado en función de su distancia de migración y utilizando como referencia la migración de la escalera de peso molecular de peso conocido (100 bp Ladder). Para la estimación de talla, el programa *Length* (Templeton & Lawrence, 1988) fue utilizado.

D. Análisis estadístico

D.1. Evaluación de los datos moleculares

El análisis estadístico de los datos moleculares se generaron a partir de la evaluación de la amplificación de las muestras de ADN de las accesiones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*.

D.2. Distancias genéticas

Se utilizó una matriz genotípica utilizando el software PowerMarker (Liu y Muse, 2005 citado por INIAP, 2010), que fue convertida en una matriz de frecuencia con datos binarios (1 y 0). Los datos que se generaron consistieron en la presencia de marcadores moleculares se califica con (1) y la ausencia se califica con (0) de marcadores moleculares (0). Posteriormente, se calculó la matriz de distancia escogiendo la opción de alelos compartidos (Shared Allele Distance, DAS). El cálculo de la distancia genética entre dos poblaciones da una

estimación relativa del tiempo que ha transcurrido desde que las poblaciones se han establecido (**Liu y Muse, 2005; INIAP, 2010**).

Cuando dos poblaciones están genéticamente aisladas, la mutación y la deriva genética contribuyen a la diferenciación de las frecuencias alélicas en locus selectivamente neutros. A medida que el tiempo de divergencia entre dos poblaciones aumenta, la diferencia en las frecuencias alélicas también tiende a aumentar. Bajas estimaciones de distancia (valores cercanos a 0) pueden indicar una subestructura de la población, o que las poblaciones están separadas desde períodos cortos de tiempo, por el contrario valores de distancia cercanos a 1 indican una mayor diferenciación genética entre las poblaciones o accesiones analizadas favoreciendo los posibles cruces entre éstas (**INIAP, 2010**).

D.3. Estructura Genética

La matriz de frecuencia fue importada del software Numerical Taxonomy and Multivariate System NTSYS ver.2.1 (**Rohlf, 2002; INIAP, 2010**) y se calculó una matriz de similitud utilizando el coeficiente SM con el fin de determinar la estructura genética de las muestras analizadas que corresponden a un análisis de agrupamiento y un análisis de coordenadas principales (PCO). Para el análisis de agrupamiento se empleó el método no ponderado UPGMA (Unweighted-Pair group method arithmetic average) donde se obtuvo un árbol o fenograma que grafica las relaciones entre genotipos. El árbol fue visualizado en TREEVIEW 1.6.6 (**Page, 2008; INIAP, 2010**).

El PCO en cambio es un método no paramétrico que permitió proyectar en un plano de dos o tres dimensiones el conjunto de muestras analizadas (Plot) en función de sus relaciones sobre dos o tres ejes de varianza. Cada eje o coordenada representó al primer, segundo y tercer eje de varianza que explican una fracción mayoritaria de la diversidad total observada. En el PCO se observó la formación de grupos genéticos de las accesiones, la diferenciación entre estos grupos fue medida según

el coeficiente de diferenciación F_{ST} en el software FSTAT (**Goudet, 2001; INIAP, 2010**).

Así:

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

Donde:

HS = heterocigosidad esperada en las subpoblaciones y ;

HT = heterocigosis esperada en la población total.

El valor F_{ST} se midió en una escala de 0 a 1, mientras menor es el valor menos intercambio genético hay entre las poblaciones. La significancia del valor F_{ST} fue testada con la prueba G mediante las correcciones de Bonferroni.

D.4. Diversidad genética

En PowerMarker (**Liu y Muse, 2005; INIAP, 2010**) los parámetros de diversidad genética calculados fueron: frecuencia de alelos, número de genotipos, número de alelos, heterocigosis total ú observada, heterocigosis esperada, contenido de información de polimorfismo (PIC).

Se realizó también un análisis de coordenadas principales en donde las variables originales definen un espacio euclideo, donde la similitud entre ellas es medida como una distancia euclidea. Los resultados de este análisis se grafican sobre ejes ortogonales que representan los componentes principales (gráficos biplot) y que delimitan un espacio bi ó tridimensional en donde los individuos se sitúan dentro del espacio delimitado por las componentes según los valores de sus coordenadas con respecto a estas (**Cornide, 2000; INIAP, 2010**)

IV. RESULTADOS

A. Extracción y cuantificación del ADN

En la presente investigación, los tres métodos de extracción de ADN genómico utilizados de: (Colombo, 1998, Doyle & Doyle, 1990), **Apendice 3 y 4. Kit PureLink Plant Total DNA Purification (INVITROGEN Catálogo N° K1830-01)**, determinaron que este último protocolo, resultó de manera comparativa ser el más eficiente en términos de cantidad y calidad de ADN para las tres especies forestales en estudio (**Figura 3**). Durante la cuantificación de las muestras de ADN extraídas con el método comercial del Kit de Invitrogen se observaron bandas claras y bien definidas, obteniéndose de esta forma muy buenos rendimientos de ADN los cuales oscilaron entre 10 a 30 μg para Amarillo, 0,2 a 3,0 μg ; para Bálsamo y 0,6 a 6,6 μg para Moral fino **Apéndice 5, 6 y 7**. Estos valores se ubican dentro de los rangos óptimos para ensayos de amplificación de ADN. En cuanto a la calidad del ADN obtenido con el protocolo establecido, ésta fue buena ya que la molécula de ADN resultó sin degradación y oxidación, posiblemente por la utilización de columnas de purificación incluidas en el kit de extracción. En cambio la oxidación de los pellets se dio con mucha frecuencia con los protocolos convencionales de **Colombo (1998), Doyle & Doyle (1990)**, por la presencia de fenoles y taninos, algo muy natural en las especies forestales.

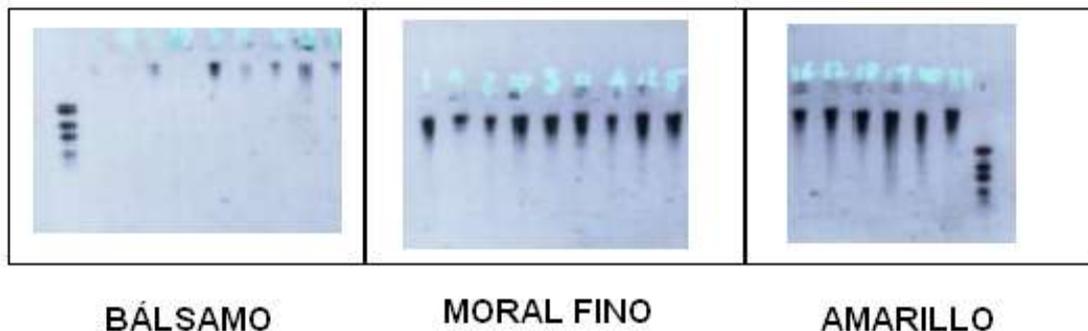


Figura 3. Cuantificación de ADN de Amarillo, Bálsamo y Moral Fino por el método de fluorescencia. EELS, INIAP, 2010

La presencia de grandes cantidades de ADN en Moral Fino y Amarillo se prestó para la confusión en cuanto a la calidad del mismo (**Figura 3**), es decir, cuando la concentración fue alta se presentó arrastre de las bandas que inicialmente se interpretó como una señal de degradación, sin embargo, estas muestras diluidas presentaron bandas de óptima calidad y fácil cuantificación.

B. Amplificación del ADN

En las tres especies forestales en estudio, se realizó la amplificación con 24 primers, obteniéndose patrones de amplificación polimórficos y explotables con 7 de ellos, los cuales mostraron mayor claridad y definición (**Figura 4, 7 y 11**).

Las secuencias de los 7 primers OPERON que presentaron mayor polimorfismo en las tres especies forestales, se expusieron en los (**cuadros 5, 6 y 7**).

B.1 RAPDs en Amarillo de Guayaquil

B.1.1. Análisis Estadístico

B.1.1.1. Registro de Polimorfismos

En el análisis genético de las 71 accesiones de Amarillo de Guayaquil utilizando siete primers RAPDS, se encontraron 26 bandas polimórficas **Figura 4**. En el registro se puede apreciar que la secuencia que más polimorfismo presentó fue la OPS-15 con 10 bandas polimórficas mientras que las secuencias con menos polimorfismos mostraron solo dos bandas polimórficas siendo estas: OPS-01, OPAN-09 y OPW-17. Las muestras N°- 10 y N°- 47 fueron eliminadas del análisis puesto que presentaron más del 10% de datos perdidos. Los respectivos rangos de amplificación, número de bandas obtenidas por primer y, el número y peso de las bandas evaluadas se exponen en la **Figura 4**:

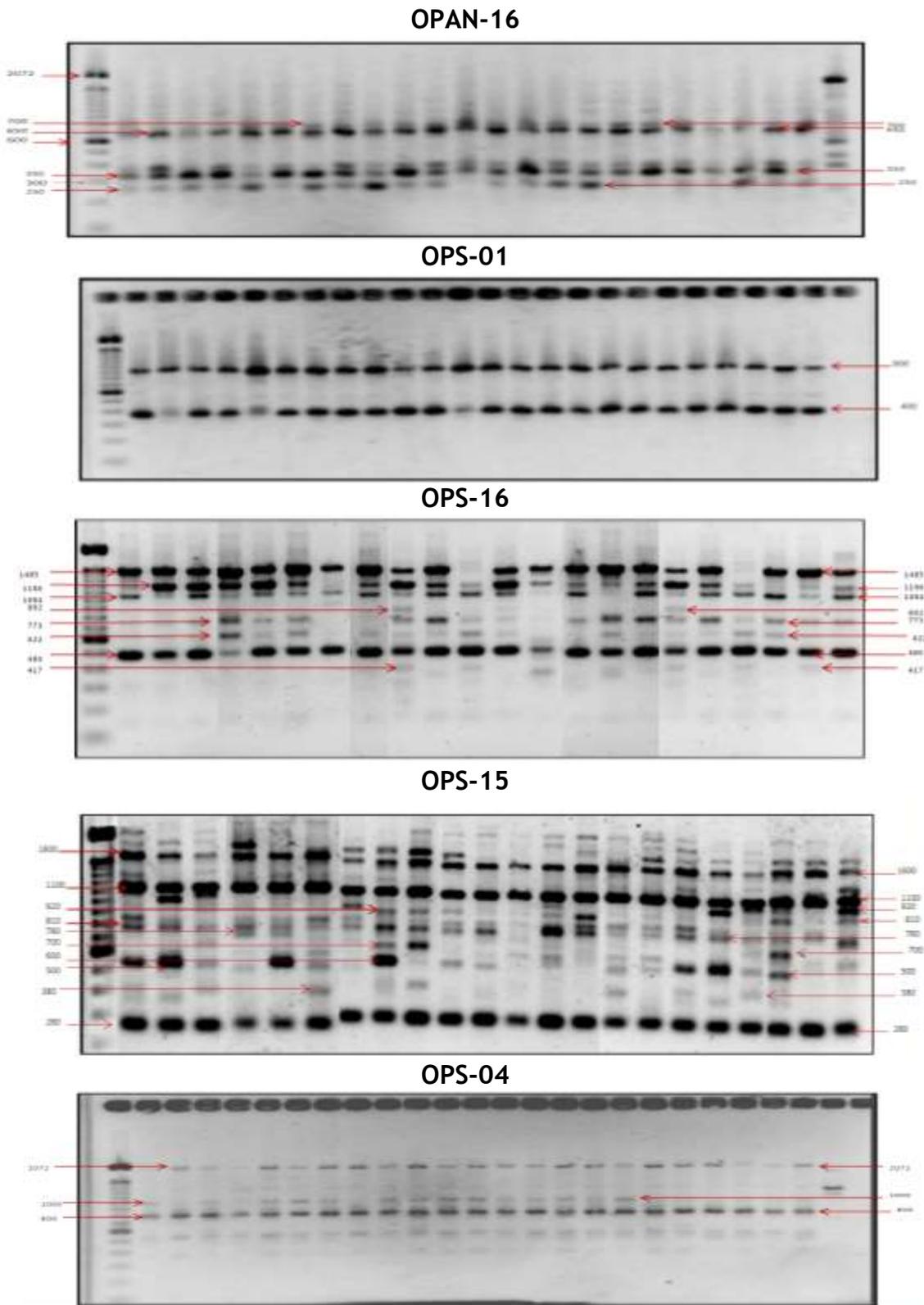


Figura 4. Registro de Polimorfismo RAPDs con los primers seleccionados en Amarillo de Guayaquil. EELS, INIAP. 2010.

B.1.1.2. Diversidad y estructura genética

Análisis Multivariado: En cuanto a los resultados del Análisis de Coordenadas Principales PCO, en dos dimensiones se encontraron dos agrupamientos principales que explican la mayor parte de la variabilidad total inter específica, en donde el primer grupo presenta a 29 accesiones, y el segundo grupo tiene 49 accesiones, los cuales sumados aportan con el 31,21% de la varianza total (**Figura 5**).

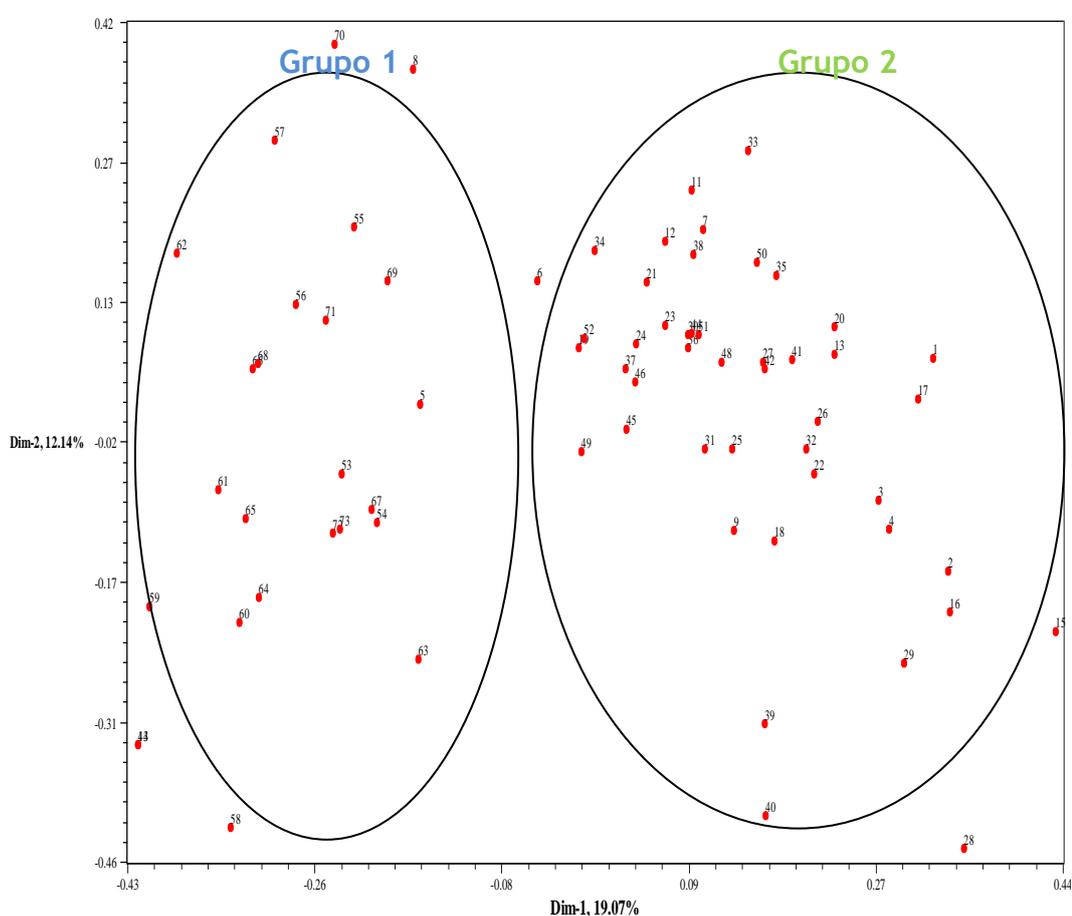


Figura 5. Análisis de coordenadas principales en 71 accesiones de Amarillo de Guayaquil. EELS, INIAP. 2010.

Clúster Analysis: El árbol UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE se presenta en la **Figura 6**. En este dendograma se separa la muestra de Paján - Manabí a una distancia de 0.57. Así mismo se observan los dos grupos formados en el PCO a una distancia de

0.70. Existen además 3 genotipos que presentan la misma información genética, perteneciendo a duplicados: Las accesiones de Manglares Churute- Guayas, Zaruma-El Oro y Pindal-Loja.

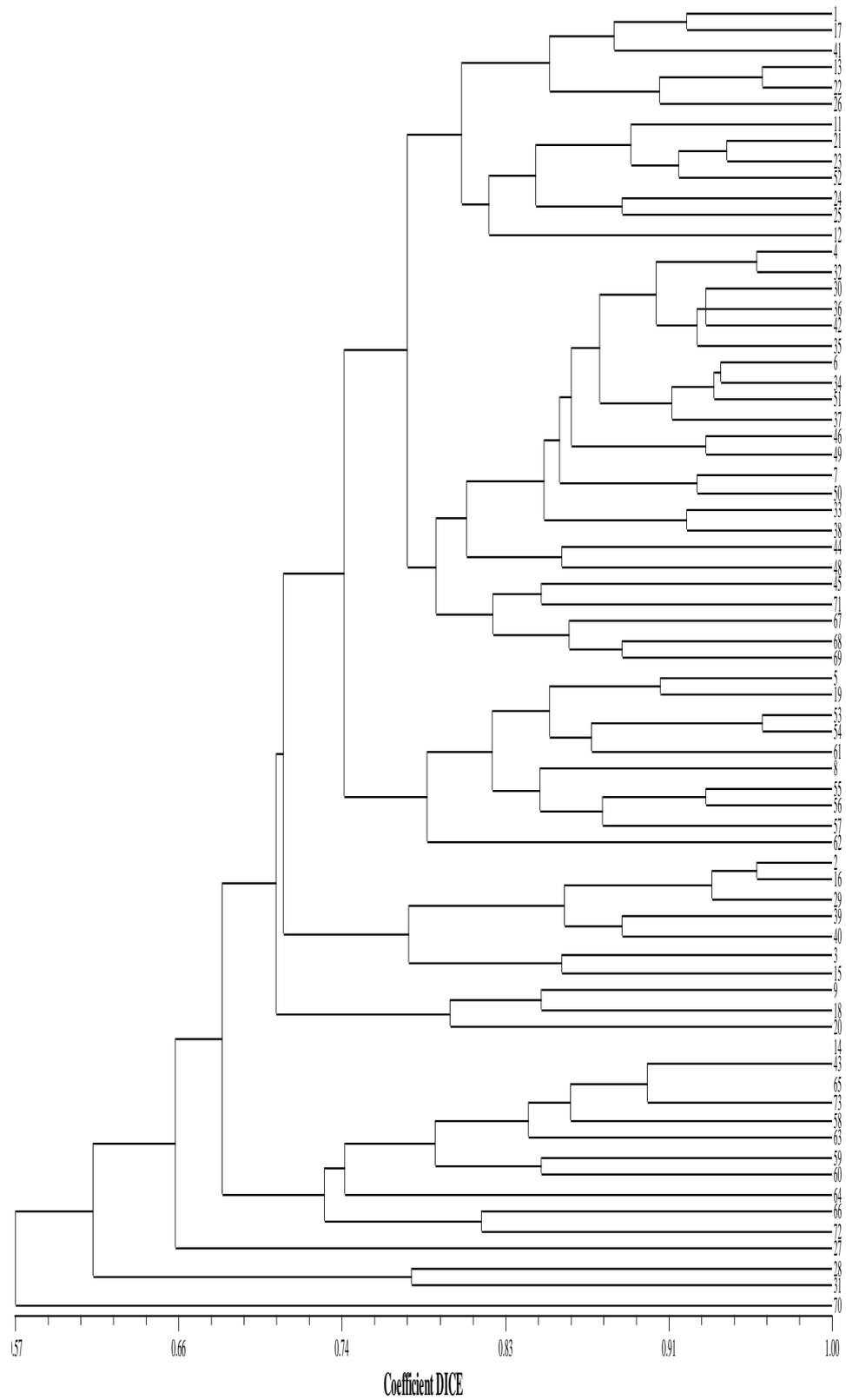


Figura 6. Dendrograma UPGMA de 71 accesiones de Amarillo de Guayaquil. EELS, INIAP. 2010.

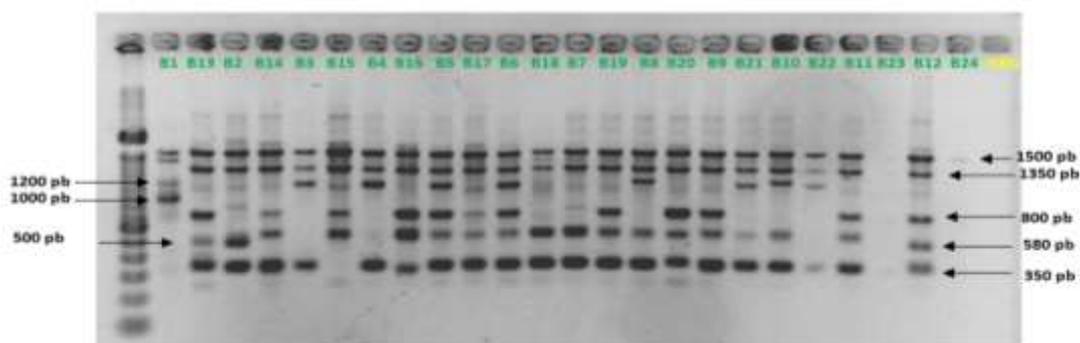
B.2 RAPDs en Bálsamo

B.2.1. Análisis Estadístico

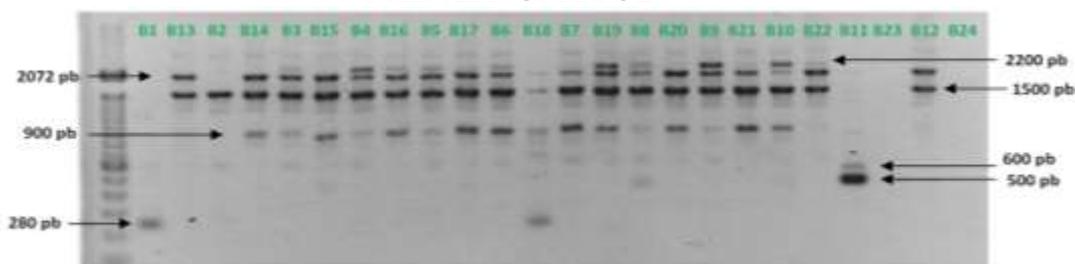
B.2.1.1. Registro de Polimorfismos

En el análisis genético de 24 accesiones de Bálsamo utilizando siete primers RAPDs se registraron 49 polimorfismos. La secuencia que más polimorfismo presentó fue la OPAA-01, con 9 bandas polimórficas mientras que la secuencia con menos polimorfismo fue la OPR-07 con 5 bandas polimórficas. Los respectivos rangos de amplificación, número de bandas obtenidas por primer y el número y peso de las bandas evaluadas se exponen a continuación en la **Figura 7**.

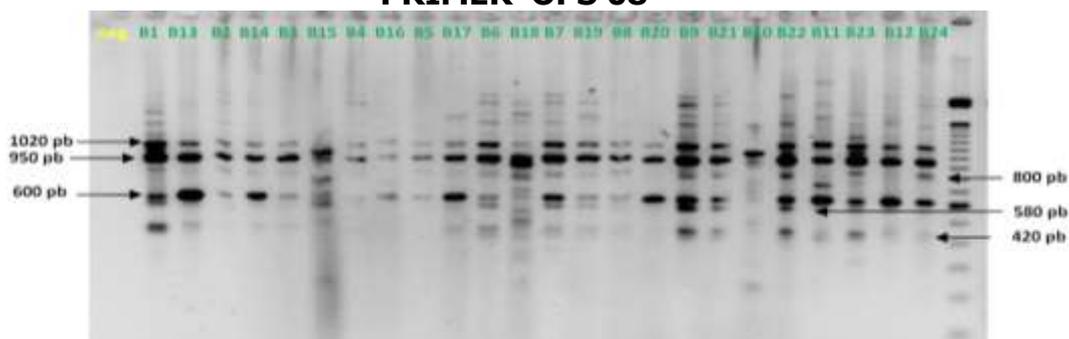
PRIMER OPS 19



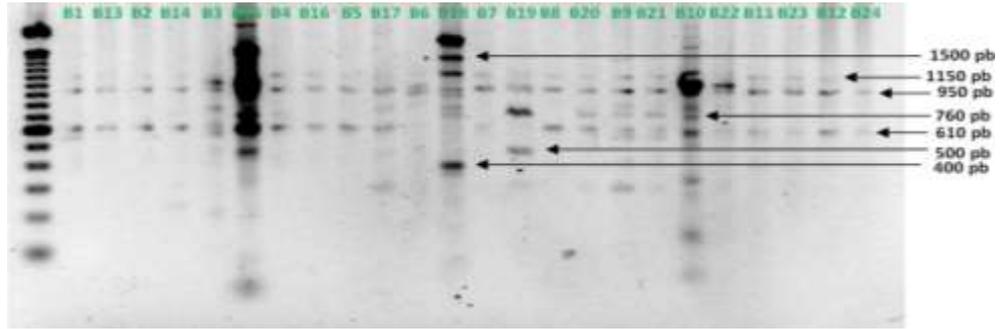
PRIMER OPAA 01



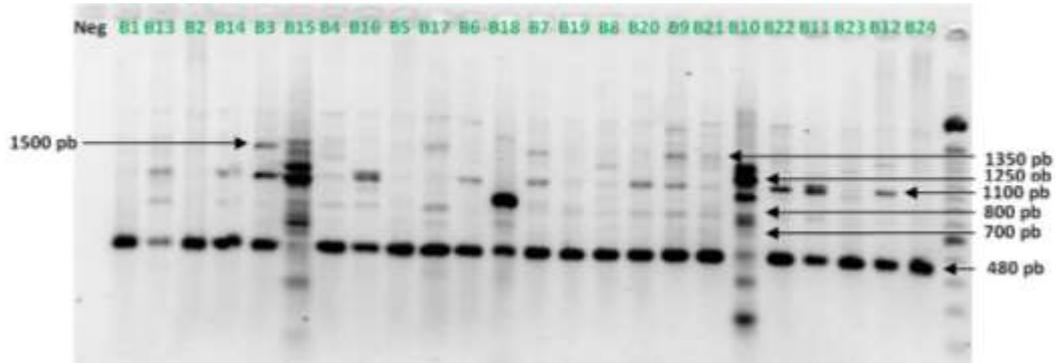
PRIMER OPS 08



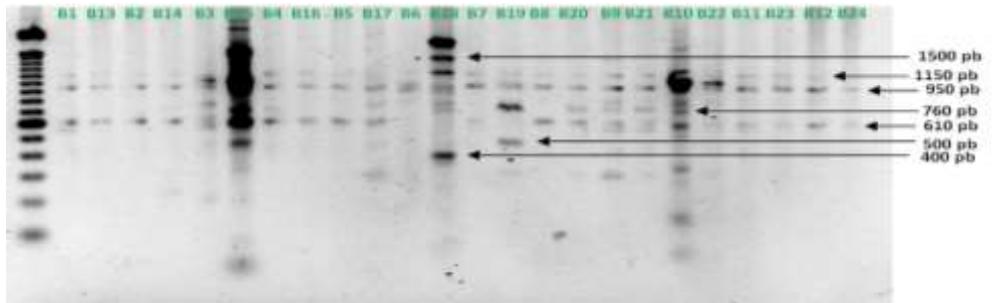
PRIMER OPR 07



PRIMER OPA 19



PRIMER OPN 17



PRIMER OPM 04

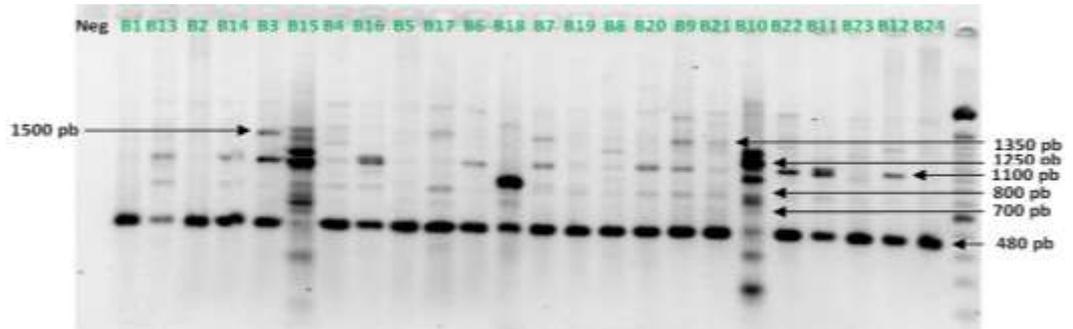


Figura 7. Registro de Polimorfismo RAPDs con 7 Primers seleccionados en accesiones de Bálsamo. EELS, INIAP. 2010.

B.2.1.2. Diversidad y estructura genética

Clúster Analysis: El árbol UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE se presenta en la figura 8. En este dendograma se puede observar que los genotipos Amazonia y Catacocha - Loja se separan del resto de muestras a una distancia de 0.53, formando un grupo aparte. El resto de accesiones procedentes de Esmeralda, Loja, Manabí y Guayas conforman otro grupo y no observan subgrupos dentro de éstas. No existen duplicados en las muestras analizadas.

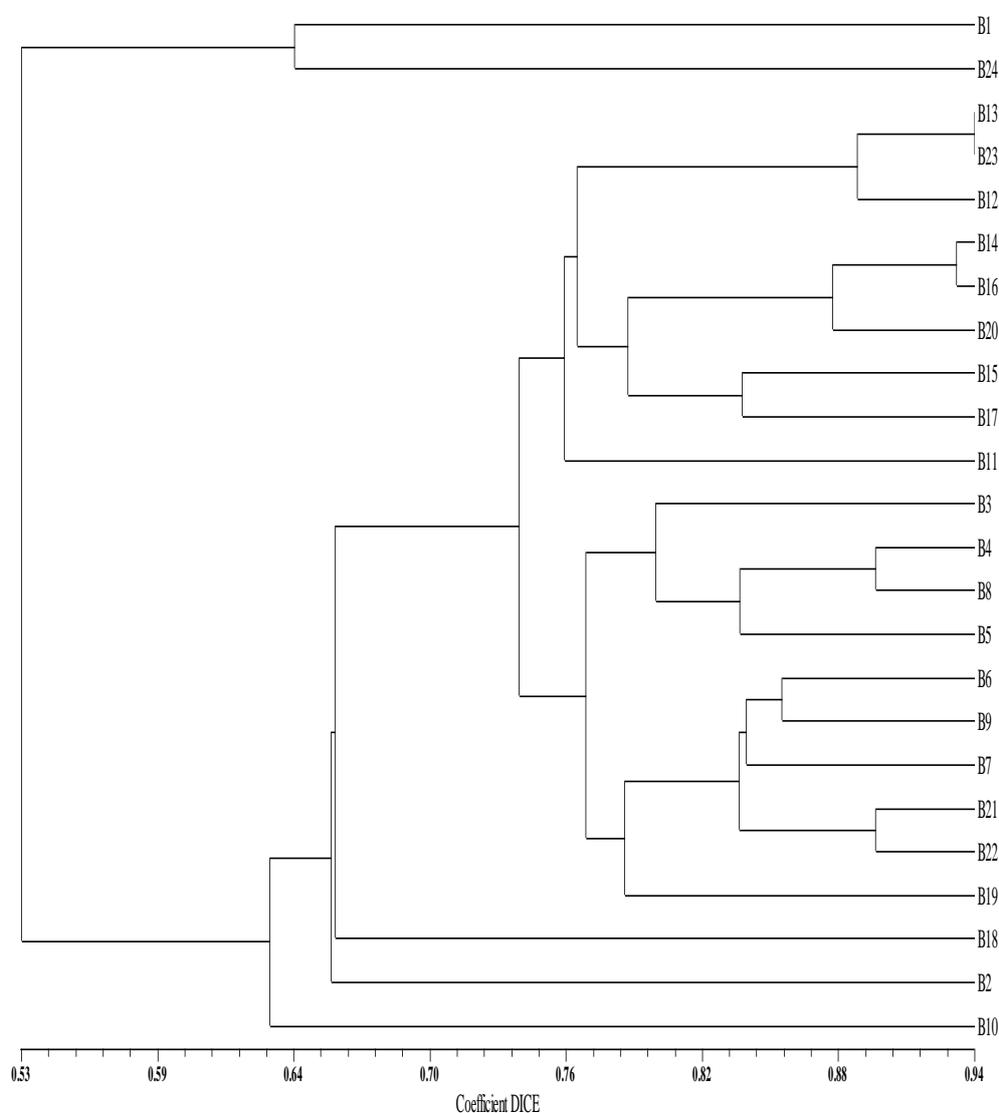


Figura 8. Dendrograma UPGMA entre 24 accesiones de Bálamo. EELS, INIAP. 2010.

Análisis Multivariado: En concordancia con el análisis de agrupamiento, en el análisis de coordenadas principales también se puede observar la separación de las muestras Amazonia y Catacocha - Loja del resto de genotipos. También se observa la accesión San Isidro - Pedernales (Manabí) y la accesión de Cerro Blanco (Guayas) como las que más cercanamente se hallan relacionadas con las muestras Amazonia y Catacocha - Loja. El PCO en dos dimensiones (**Figura 9**) muestra el 34.89% de la varianza total, mientras que el PCO en tres dimensiones (**Figura 10**) muestra el 45.83 de la varianza.

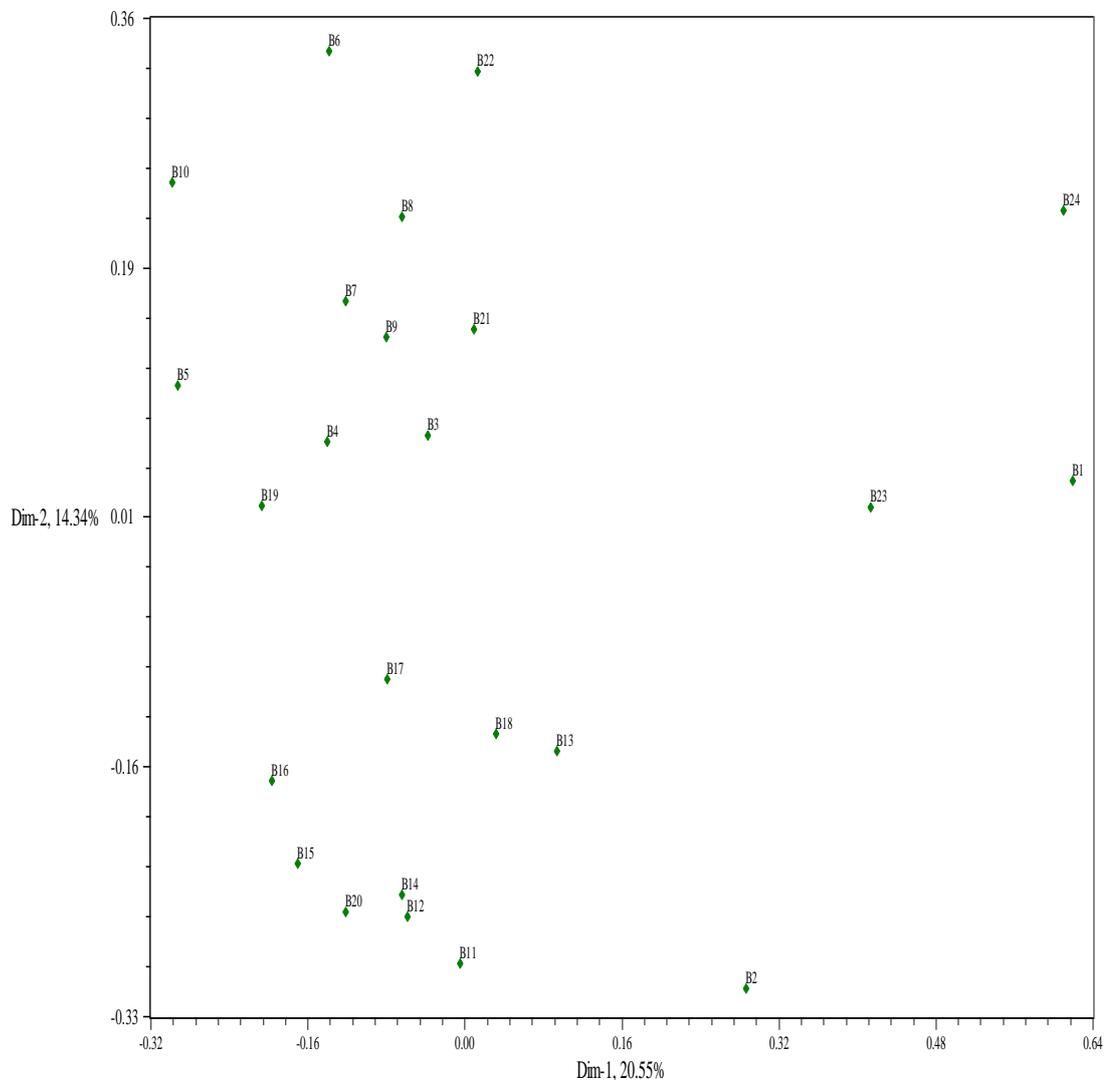


Figura 9. Análisis de coordenadas principales en dos dimensiones de 24 genotipos de Bálsamo. EELS, INIAP, 2010.

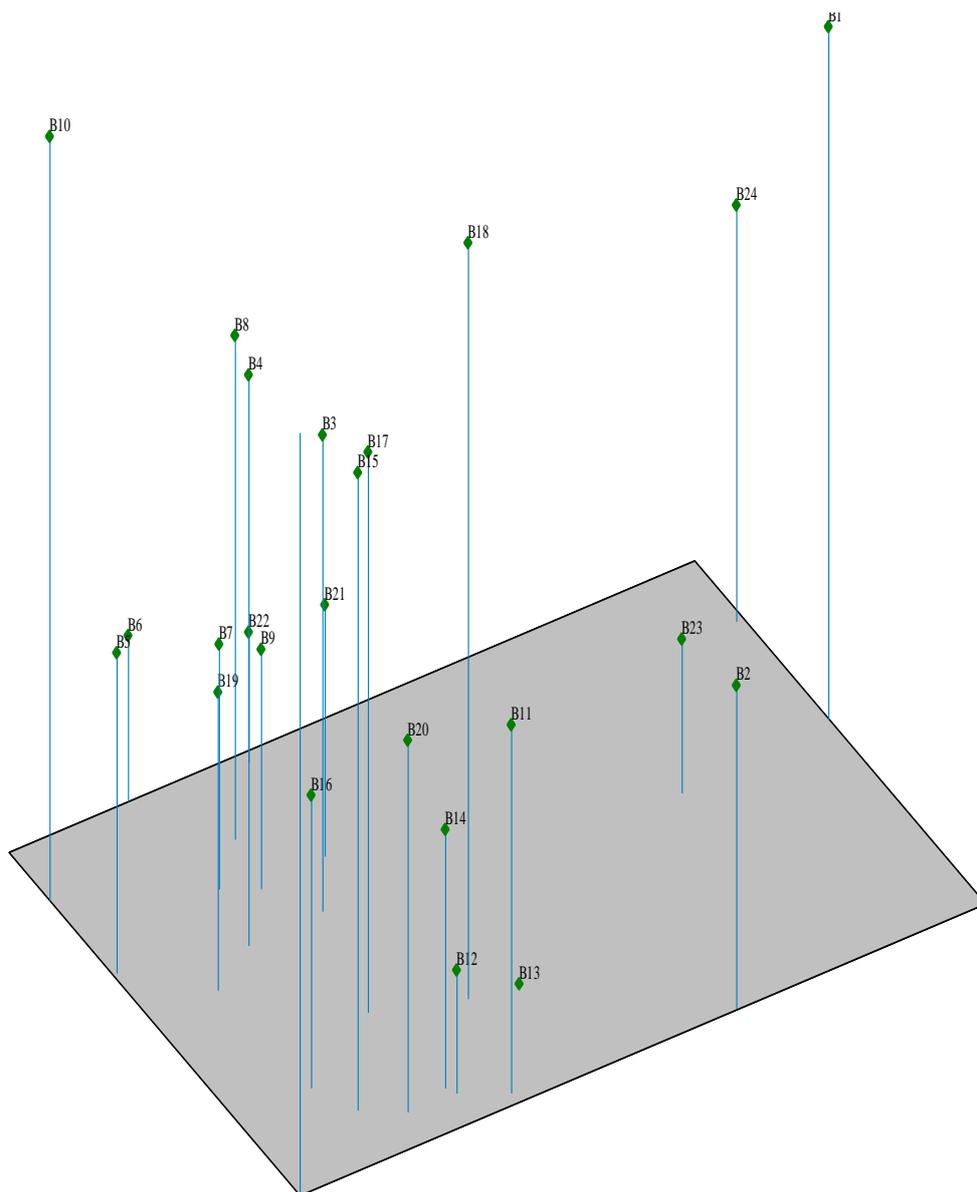


Figura 10. Análisis de coordenadas principales en tres dimensiones de 24 genotipos de Bálsamo. EELS, INIAP, 2010.

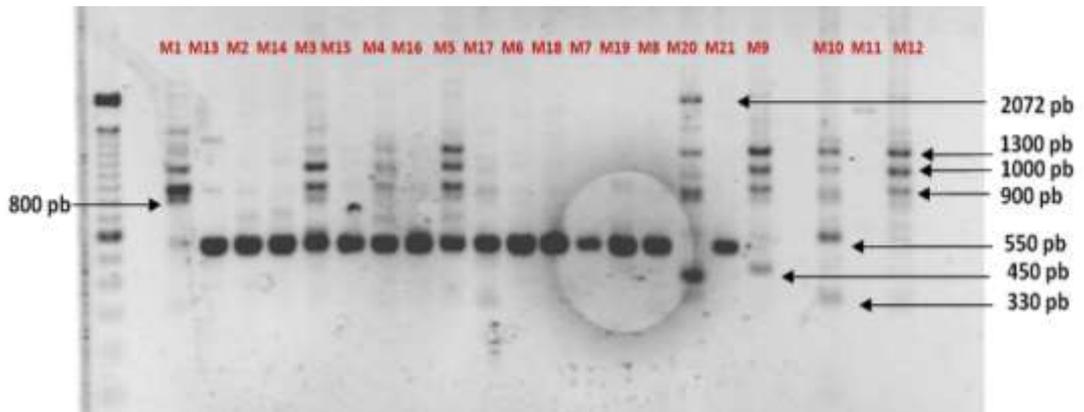
B.3 RAPDs en Moral Fino

B.3.1. Análisis Estadístico

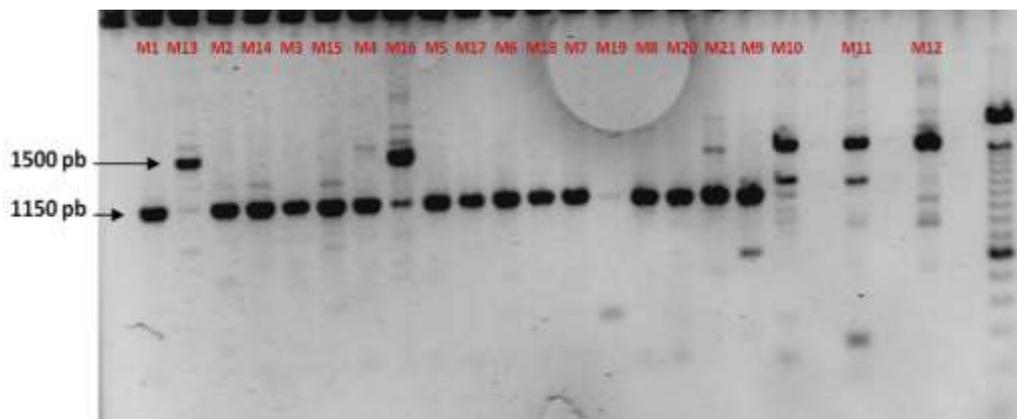
B.3.1.1. Registro de Polimorfismos

En el análisis genético de 21 accesiones de Moral fino utilizando seis primers RAPDs se registraron 44 polimorfismos. La secuencia que más polimorfismo presentó fue la accesión N°- 3 perteneciente a Pichincha - Manabí, con 12 bandas polimórficas mientras que la secuencia con menos polimorfismo fue la accesión N°- 2 perteneciente a Pichincha - Manabí con solo 2 bandas polimórficas. Los respectivos rangos de amplificación, número de bandas obtenidas por primer y, el número y peso de las bandas evaluadas se exponen en la **Figura 11**.

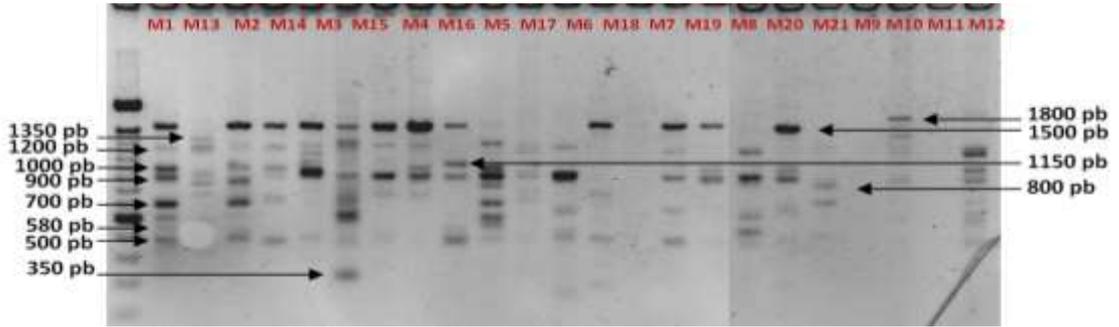
PRIMER OPAC-01



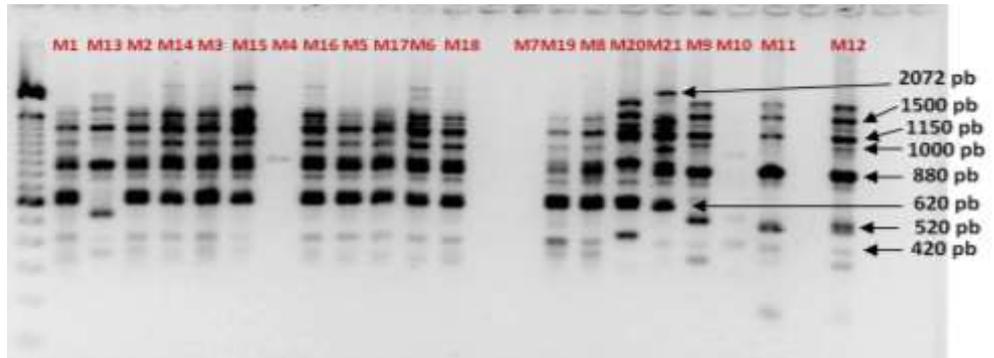
PRIMER OPA-19



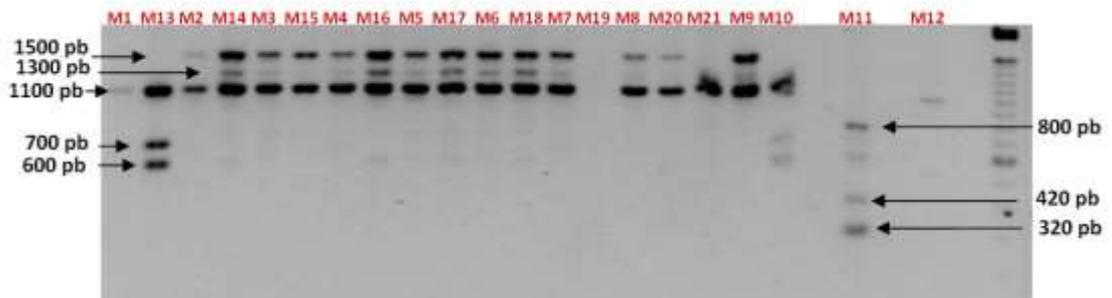
PRIMER OPR-07



PRIMER OPAA-09



PRIMER OPW-12



PRIMER OPAA-13

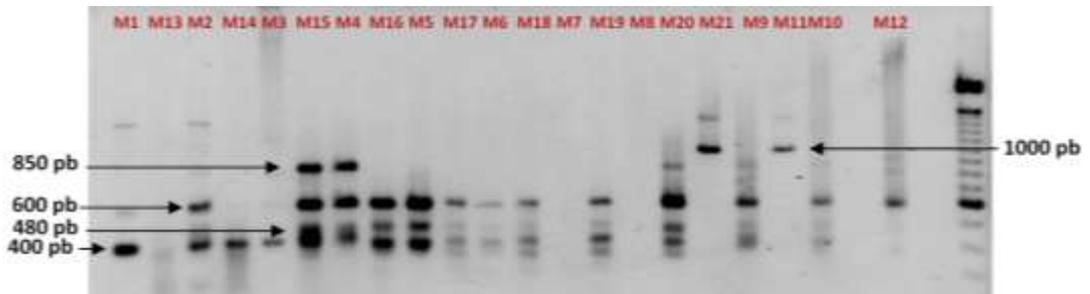


Figura11. Registro de Polimorfismo RAPDs con 6 Primers seleccionados en accesiones de Moral Fino. EELS, INIAP, 2010.

B.3.1.2. Diversidad y estructura genética

Clúster Analysis: El árbol UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE se presenta en la **Figura 12**. En este dendograma se puede observar que el genotipo procedente de la provincia de Loja (Palomontón) se separa de las demás muestras a una distancia de 0.38, formando un grupo aparte. El resto de muestras que conforman el otro grupo se separan posteriormente en dos subgrupos a una distancia de 0.48. No existen duplicados en las muestras analizadas.

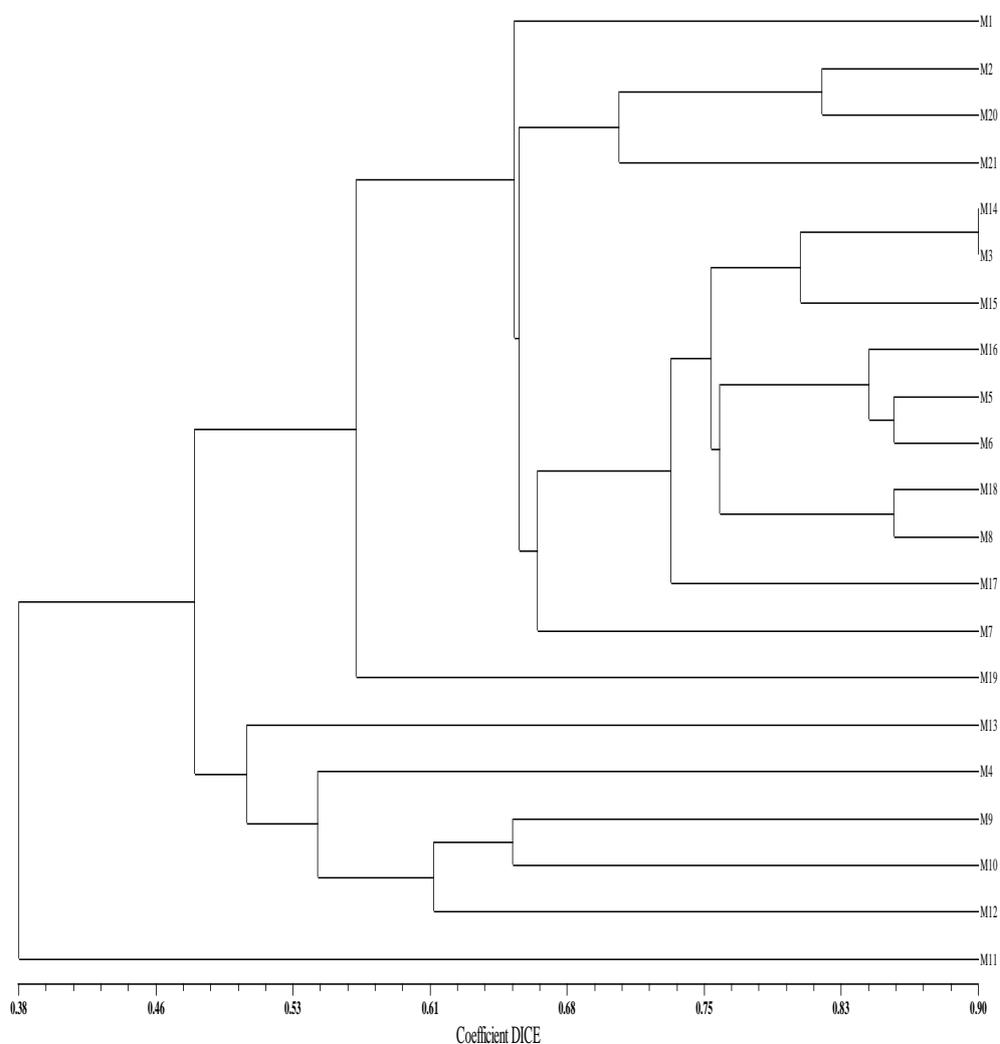


Figura 12. Dendrograma UPGMA entre 21 accesiones de Moral Fino. EELS, INIAP. 2010.

Análisis Multivariado: En concordancia con el análisis de agrupamiento, en el Análisis de coordenadas principales también se puede observar la clara separación de la accesión perteneciente a la provincia de Loja (Palomontón) del resto de genotipos. El PCO en dos dimensiones (**Figura 13**) muestra el 35.58% de la varianza total, mientras que el PCO en tres dimensiones (**Figura 14**) muestra el 46.21 de la varianza.

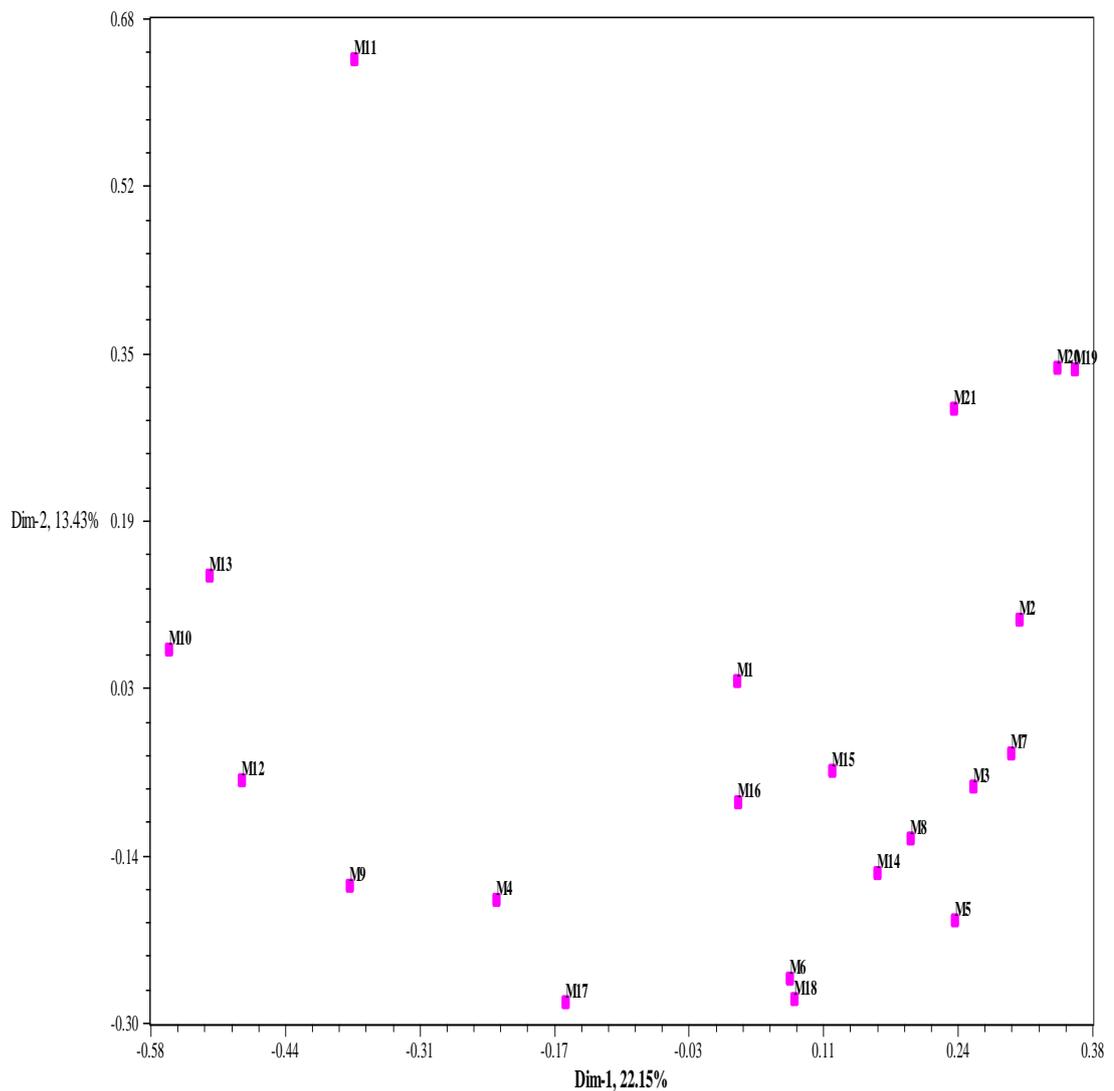


Figura13. Análisis de coordenadas principales en dos dimensiones de 21 genotipos de Moral Fino. EELS, INIAP. 2010.

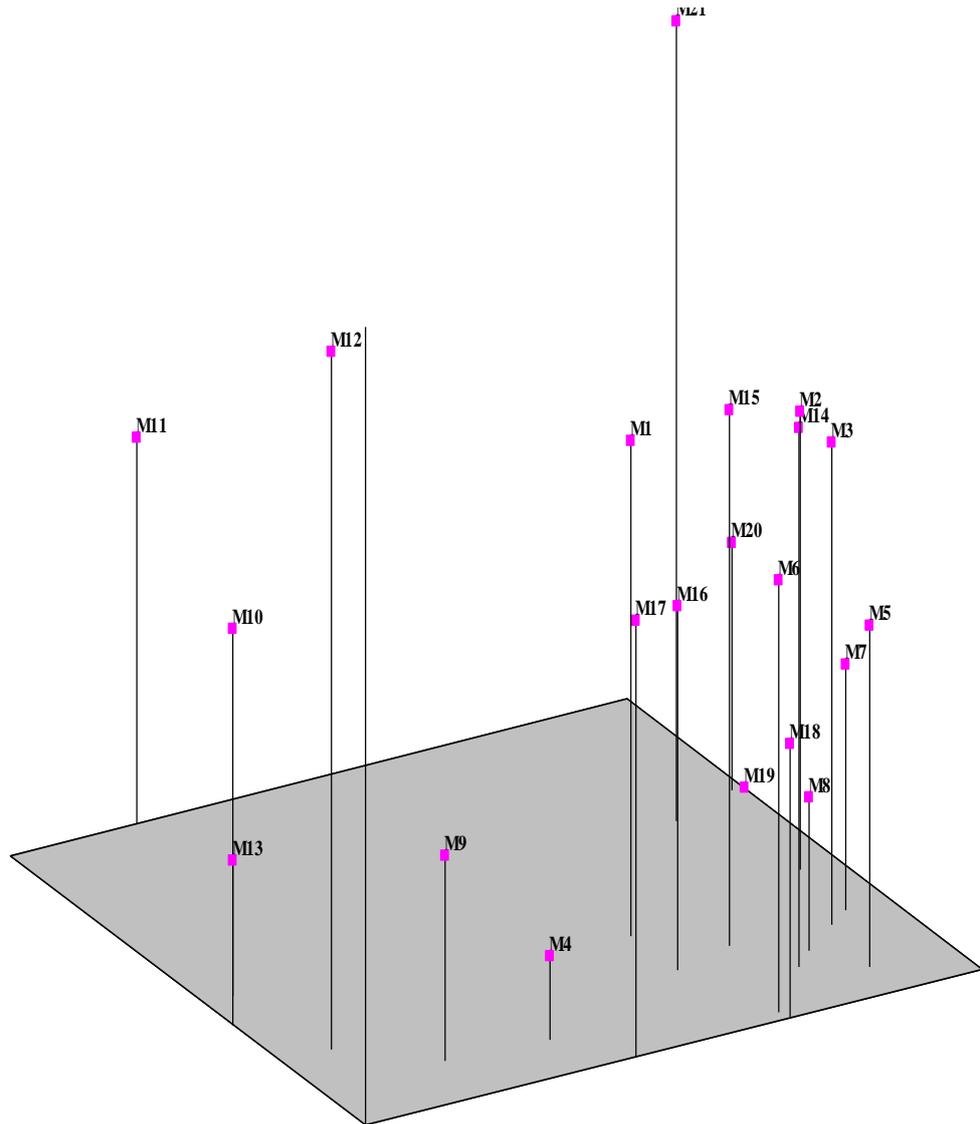


Figura14. Análisis de coordenadas principales en tres dimensiones de 21 genotipos de Moral Fino. EELS, INIAP. 2010.

V. DISCUSIÓN

El análisis de la diversidad genética presente en las accesiones de Amarillo, Bálsamo y Moral fino mediante el uso de la técnica RAPDs mostró ser una herramienta práctica y útil para estimar las distancias genéticas presentes en las poblaciones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* existentes en el Banco de germoplasma de estas especies forestales existentes en las Estaciones Experimentales Litoral Sur y Portoviejo del INIAP.

Diversos autores han resaltado la importancia de la selección de un método adecuado de extracción del ADN para obtener resultados confiables en los estudios de variación molecular en plantas (**Boiteux et al., 1999; Drabková et al., 2002**). El empleo de métodos convencionales para la extracción de ADN genómico como los propuesto por Colombo (1998), Doyle & Doyle (1990), basados en el uso de del CTAB, en el tampón de extracción, respectivamente ha dado muy buenos resultados en diversas especies vegetales. Para el aislamiento de ADN de Amarillo, Bálsamo y Moral fino se realizó de manera preliminar ensayos con los protocolos convencionales de obtención de ADN de las especies forestales en estudio. Sin embargo, en la presente investigación no se logró obtener la calidad de ADN óptima para los análisis moleculares mediante estos protocolos de extracción. Según **Couch y Fritz (1993)**, esto se debe a los altos niveles de polisacáridos y compuestos fenólicos que poseen los tejidos de las especies forestales. Por ello, se realizaron exploratorios empleando el Kit *PureLink Plant Total DNA Purification* (INVITROGEN Catálogo N° K1830-01) el cual es un protocolo comercial de extracción de ADN genómico, resultando este último más eficiente que los convencionales. El resultado de obtención de ADN de las tres especies forestales por medio del protocolo Kit *PureLink Plant Total DNA Purification* (INVITROGEN Catálogo N° K1830-01) fueron satisfactorios en términos de concentración y calidad. Según **Hills et al., (1990)**, plantearon que la utilidad o ventaja de un protocolo de extracción de ADN con respecto a otros está directamente relacionada con el método de preservación del material inicial (fresco, seco o congelado) lo cual tiene una gran incidencia a la hora de obtener un ADN de alta pureza y cantidad, suficiente para el desarrollo de

marcadores moleculares basados en PCR. De manera similar, el estado sanitario, fisiológico y químico de las muestras, inciden en la pureza y cantidad del ADN (**Michiels et al., 2003**).

Los rendimientos de ADN obtenidos oscilaron entre 15 µg para amarillo, 1,5 µg para Bálsamo y 3,4 µg para Moral fino. Estos valores se ubican dentro de los rangos óptimos para ensayos de amplificación de ADN. En cuanto a la calidad del ADN obtenido, ésta fue buena ya que la molécula de ADN resultó sin degradación y esto se corroboró a través de la validación de la amplificación de las muestras, siendo estas consistentemente amplificable en los tres materiales forestales a través de la técnica de RAPDs utilizando los primers OPERON OPR-07, OPR-20, OPA14.

Una vez validado el ADN de los forestales se determinaron primers RAPDs que fueron informativos y polimórficos para las tres especies que se analizaron. El polimorfismo detectado fue satisfactorio ya que de 24 primers probados, 7 presentaron locis polimórficos en cada uno de las especies analizadas.

La información bibliográfica, y antecedentes en estudios a nivel molecular en torno a *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* es muy limitada; por no decir nula, debido a la poca investigación que existe en la caracterización del contenido genético de especies forestales pertenecientes a la ecorregión de bosque seco del Litoral Ecuatoriano.

Como resultado se obtuvo en Amarillo de Guayaquil 26 bandas polimórficas, siendo la secuencia la OPA-15 que más polimorfismo presentó con un total de 10 bandas polimórficas mientras que las secuencia con menos polimorfismo fueron: OPS-01, OPAN-09 y OPW-17, mediante el árbol UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE. En este dendograma se separa la accesión de Amarillo de Guayaquil de Paján- Manabí a una distancia de 0.57. Así mismo se observaron los dos grupos formados en el PCO a una distancia de 0.70. Existen además 3 genotipos que presentan la misma información

genética, perteneciendo a duplicados: Manglares Churute- Guayas, Zaruma-El Oro y Pindal-Loja.

En Bálsamo mediante el análisis genético de 24 muestras utilizando 7 primers RAPDs se registraron 49 polimorfismos. La secuencia que más polimorfismo presentó fue la OPAA-01, con 9 bandas polimórficas mientras que la secuencia con menos polimorfismo fue la OPR-07 con 5 bandas polimórficas. A través del árbol o dendograma UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE. Los genotipos de la Amazonía y Catacocha - Loja se separan del resto de muestras a una distancia de 0.53, formando un grupo aparte. El resto de accesiones procedentes de las provincias de: Esmeraldas, Loja, Manabí y Guayas conforman otro grupo y no observan subgrupos dentro de éstas. No existen duplicados en las muestras analizadas. De la misma manera y en concordancia con el análisis de agrupamiento (UPGMA), en el análisis de coordenadas principales también se pudo observar la separación de las muestras de la Amazonia y Catacocha - Loja del resto de genotipos procedentes de la provincia de Esmeralda, Loja, Manabí y Guayas. También se observó la accesión San Isidro - Pedernales (Manabí) y la accesión de Cerro Blanco (Guayas) pertenecientes a la provincia del Guayas como las que más cercanamente se hallan relacionadas con la accesión perteneciente a la Amazonia y Catacocha - Loja.

En Moral fino a través del análisis genético de 21 muestras utilizando 6 primers RAPDs registraron 44 bandas polimórficas. La secuencia que más polimorfismo presentó fue la de Pichincha - Manabí con 12 bandas polimórficas mientras que la secuencia con menos polimorfismo fue la Pichincha - Manabí con solo 2 bandas polimórficas.

Estos resultados concuerdan con los reportados por **Sharma et al., (1996)** y **Muluvi et al., (1999)**, quienes mencionaron la necesidad de utilizar un considerable número de cebadores alrededor de 10, para mejorar la estimación de los parámetros genéticos de poblaciones de plantas. El rango de amplificación fue de 5 a 11 productos, resultados similares fueron obtenidos

en trabajos previos sobre caracterización molecular con promedios de 5 y 6 productos (INIAP, 2004; Lerceteau *et al.*, 1992).

El árbol UPGMA obtenido utilizando el coeficiente DICE se presentó en la **Figura 12**. Se pudo observar en este dendograma que el genotipo procedente de la provincia de Loja (Palomontón) se separa de las demás muestras a una distancia de 0.38, formando un grupo aparte. El resto de muestras que conforman el otro grupo se separan posteriormente en dos subgrupos a una distancia de 0.48. No existen duplicados en las muestras analizadas. En concordancia con el análisis de agrupamiento (UPGMA), en el Análisis de coordenadas principales también se pudo observar (**Figuras 13 y 14**) la clara separación de la accesión procedente de Loja (Palomontón) del resto de genotipos.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

A. Conclusiones

- ✚ La aplicación de esta técnica en la caracterización de materiales genéticos constituye un aporte significativo al conocimiento de los recursos autóctonos, escasamente estudiados hasta ahora, y una innovación útil si se quiere profundizar en el conocimiento molecular detallado del genoma de los distintos bancos de germoplasma existentes en el país.

- ✚ El uso de marcadores RAPDs para el análisis de diversidad genética en tres especies forestales: amarillo, moral fino y bálsamo, permitió obtener patrones de amplificación claros que en cada caso discriminaron las muestras analizadas evidenciando una estructuración genética en el material estudiado.

- ✚ El análisis genético de 21 muestras de moral fino con 6 secuencias RAPDs separó a la muestra nº. 11 del resto de muestras estudiadas. Adicionalmente el resto de muestras se formó dos subgrupos claramente diferenciados a una distancia de 0.48.

- ✚ Para el caso de bálsamo, se observó la formación de dos grupos, el primero formado por los genotipos de la Amazonia y Catacocha - Loja y el segundo formado por el resto de genotipos.

- ✚ Adicionalmente, el estudio enriquece los datos de los sistemas de información de las distintas accesiones de los bancos de germoplasma, al aportar información específica sobre descriptores moleculares específicos para cada marcador usado, y sobre las características de los geles y las matrices binarias para el análisis e interpretación de los resultados. Con la

aplicación de métodos estadísticos adecuados, esta información permitirá darle consistencia a los datos y validar la información generada.

B. Recomendaciones

- ✚ Durante la extracción de ADN en Amarillo de Guayaquil se presentó mucha oxidación y degradación de este, por lo que se recomienda utilizar tejido en estado joven como brotes axilares.

- ✚ La información obtenida en la presente investigación mediante la técnica RAPDs se debe complementar con otras técnicas de marcaje molecular, por ejemplo una de ellas AFLPs y de esta manera caracterizar el contenido genético de estas especies forestales de manera más específica.

- ✚ Realizar correlaciones entre la caracterización genotípica con la caracterización morfológica y ecológica de cada especie en estudio. Con la finalidad de proveer un amplio y real conocimiento de la diversidad existente en estos forestales.

VII. RESUMEN

La presente labor investigativa se llevó a efecto en la Estación Experimental del Litoral Sur (EELS) del INIAP, donde se colectaron las muestras de las especies forestales en estudio. La Estación Experimental está ubicada en el Km 26, parroquia Virgen de Fátima, Yaguachi, provincia del Guayas. La extracción de ADN se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo ubicada en el Km. 1,5 vía Quevedo – Santo Domingo de los Tsáchilas, en la provincia de Los Ríos y el Laboratorio de Biotecnología de la EELS. Finalmente se efectuó el genotipaje de las accesiones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* en el Laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina del INIAP ubicado en la Panamericana Sur km 1, Vía Tambillo, Sector Cutuglagua, en la provincia de Pichincha.

El objetivo general propuesto fue: Caracterizar molecularmente las accesiones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, para estimar el grado de diversidad genética presente en las respectivas poblaciones del Banco de Germoplasma Forestal de la Estación Experimental del Litoral Sur, y los objetivos específicos; Determinar el nivel de variación y relación genética existente en las accesiones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, a través de la técnica molecular RAPDs; Evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPDs para caracterizar el contenido genético de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*; los mencionado objetivos se sujetaron a la hipótesis; Existe variabilidad genética entre las poblaciones de *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* detectada a través de marcadores moleculares; Los marcadores moleculares RAPDs son eficientes para la caracterización de la variabilidad genética.

La técnica RAPDs, fue utilizada para evaluar las relaciones genéticas entre 75 accesiones de *C. ochroxylum*, 24 accesiones de *M. peruiferum* y 21 accesiones de *M. tinctoria*, las mismas que fueron colectadas en las provincias de Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos y Manabí. El análisis

estadístico “clúster análisis” y “PCO” se realizó en base al registro de polimorfismo que arrojó cada forestal como en el caso ***C.ochroxylum***, se obtuvieron 26 bandas polimórficas a partir de 7 primers RAPDs, con ***M. peruiferum***, se registró 49 polimorfismos utilizando 7 primers, y por último con ***M. tinctoria*** se registraron 44 bandas polimórficas a partir de 6 primers. Los resultados agruparon las accesiones de cada especie entre ellas. El dendograma separó claramente grupos y subgrupos dentro de los tres forestales en estudio, en base a estos resultados, se evidencia la estructuración del material genético de las especies en estudio, además en el caso de Bálsamo se sujeta la hipótesis de denominar a los materiales colectados en la zona de la Amazonía y Catacocha como un nuevo taxón del género ***Myroxylon***. Los resultados sugieren posibles eventos de hibridación intraespecífica dentro del género ***Myroxylon***.

VIII. SUMMARY

The present investigative work was taken to effect in the Station Experiment of Litoral South (EELS) of the INIAP, where was collected the sample of the trees in study. The Station Experiment, located in the Km 26, Way to Yaguachi – Guayas. The extract of DNA was made in the Laboratory of Biotechnology of the University Technique State of Quevedo, located in the Km 1,5 via Quevedo – Santo Domingo de los Colorados, and the Laboratory of the EELS. Finally was taken to effect the genotyping of the samples of *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, in the Laboratory of Biotechnology of the Station Experiment Santa Catalina of the INIAP, located on the Panamericana South km 1, via Tambillo, Enclosure “Cutuglagua”, Pichincha.

The proposed general objective was: Characterizar molecularly the accessions of *C. ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria*, for to determinate the degree of genetic diversity in the poblations of the tree germplasm bank of the EELS, and the specific objectives; To determinate the genetic relation- variation level present in the species in study using the RAPD technique molecular; Traits the efficient the RAPD molecular markers for to characterisate the genetic content of the three trees, subject to the hypothesis; Exist genetic variability between the poblations of *C.ochroxylum*, *M. peruiferum* y *M. tinctoria* detected through of molecular markers; the RAPD molecular markers are efficient by analysing the genetic variability.

The RAPD technique was used to assess the genetic relationships among 78 accessions of *C.ochroxylum*, 24 accessions of *M. peruiferum* y 21 accessions of *M. tinctoria*, was collected in the provinces of Azuay, Cañar, Loja, El Oro and Zamora Chinchipe Cotopaxi, El Oro, Esmeraldas, Guayas, Loja, Los Ríos y Manabí, to the Litoral of the Ecuador. The statistic analysis "cluster analysis" and "PCO" was accomplished in base to polymorphism registre how in the case *C.ochroxylum* able to generated 26 bands polymorphism obtained from 7 RAPD primers, with *M. peruiferum*, was obtain 49 polymorphism was use 7 RAPD primers, and for ultimate with *M. tinctoria* was obtain 44 bands

polymorphism obtained from 6 RAPD primers. The results grouped the accessions of each kind between them. The dendrogram separated clearly groups and subgroups in of the three species tree in study, in base to these results, revealed the structuration of the genetic material of the species tree in study, furthermore it is supported the hypothesis of designating to the materials collected in the zone of the Amazonía and Catacocha as a new taxón of the genera ***Myroxylon***, the result suggest possible events of hybridizing interspecific within genera ***Myroxylon***.

VII BIBLIOGRAFIA

- Aguirre, Z;** Lars, P. 2005 Composición florística y estado de conservación de los bosques secos del sur-occidente del Ecuador. *Lyonia* 8,41-67.
- Ahuja, M.R.** 2001. Recent Advances in Molecular Genetics Forest Trees. Institute of Forest Genetics. 3 p.
- Arguedas, A.** 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 91 p.
- Balbas, P;** Zapata, F. 1989. Ingeniería Genética y Biotecnología. Washington, US, Secretaría General de la O.E.A. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. p. 5-9.
- Becerra, V;** Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60(3): 270-281.
- Boiteux, L. S.;** Fonseca, M.E.N. and Simon, P.W. 1999. Effects of Plant Tissue and DNA Purification Method on Randomly Amplified Polymorphic DNA-based Genetic Fingerprinting Analysis in Carrot. *Amer. Soc. Hort. Sci.* 124 (1): p. 32-38
- Bucci, G;** Binelli, G; Menozzi, P. 1995. Identification of a New Set of Molecular Markers in Norway spruce as Revealed by Random Amplification Techniques. In: Baradat Ph; Adams W.T; Muller-Starck, G. (eds.), *Population Genetics and Gene Conservation*, SPB Academic Publishing, The Hague, The Netherland. p. 121-127.
- Cabrera, O;** Aguirre, Z; Quizhpe, W; Alvarado, R. 2002. Estado actual de conservación de los bosques secos del sur-occidente ecuatoriano p. 65-78. En Aguirre Z(Ed). *Botánica Austroecuatoriana. Estudios sobre los recursos vegetales en las provincias de El Oro, Loja y Zamora Chinchipe*. Loja, EC, Editorial ABYA YALA, UTPL. p.
- Canchignia, F.** 2007. Diversidad genética de ecotipos de *Schizolobium parahybum*. del Ecuador. Tesis Mag. Sc. Guayaquil, EC, Universidad de Guayaquil. p 69.

- Chong**, LK; Tan, SG; Yusoff, K; and Siraj, SS. 2000 Identification and characterization of Malaysian River catfish, *Mystus nemurus* (C&V): RAPD and AFLP analysis Biochem. Genet. 38:63-76.
- Colombo**, C; Second, G; Charrier, A. 1998. Diversity within American Cassava germplasm based on RAPD markers. Genetic & Molecular Biology. 23 (1): 189-199.
- Cornelius**, J. 1998. Selección y manejo de fuentes semilleras en América Central y República Dominicana. Turrialba, CR, CATIE. p. 9-21.
- Cornide**, M. T. 2000. Diversidad genética y marcadores moleculares. La Habana, CU. Departamento de Bioplantitas CINC 150 p.
- Couch**, J.A. and Fritz, P.J. 1993. The genome of the tropical tree *Theobroma cacao* L. Molec. Gen. Genetics. 237. 123-128.
- Delgado**, T. y Aguirre, Z. 2002. Vegetación de los bosques secos de Cazaderos-Mangaurco, occidente de la provincia de Loja. Quito, EC, Ecociencia
- Doyle**, J.J; Doyle, J.L. 1991. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochem. Bull. 19: 11- 15 pp.
- Dodgson** JB. Cheng HH; and Okimoto R 1997 DNA marker technology a revolution in animal genetics. Poultry Sci 76: 108-1114.
- Duke**, J. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. New York, NY: Plenum Press, pp. 173-177.
- Drabková**, L.; Kirschnner, J. and Vleck, C. 2002. Comparison of seven DNA extraction and amplification protocols in historical herbarium specimens of *Juncaceae*. Plant Mol. Biol. Reporter. 20 (2): p.161-175.
- Erlich**, H.A. 1989. PCR. technology: principles and applications for DNA amplification. New York, US, Stockton. 246p.

- Ferreira, M.E;** Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, BR, EMBRAPA-CENARGEN. p 220.
- Frankham, R.** 2003. Genetics and conservation biology. *Comp. Rend. Biol.* 326: 22-29.
- Goudet.** 2001. FSTAT, a program to estimate and tgest gene diversities ad fixation indices (version 2.9.3). Disponible en internet en <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
- Herbario Loja, UNISIG** (La Unidad de Inteligencia Artificial y Sistemas de Información Geográfica), CINFA (Centro de Informática Agropecuaria). 2001. Zonificación y determinación de los tipos de Bosque seco en el suroccidente de la provincia de Loja. Informe Final. Herbario Loja. Proyecto Bosque Seco, Loja, EC, Universidad Nacional de Loja, Ecuador. 144 p.
- Herbario Loja, UNISIG** (La Unidad de Inteligencia Artificial y Sistemas de Información Geográfica), CINFA (Centro de Informática Agropecuaria). 2003. Zonificación ecológica de los seis cantones de influencia del Proyecto Bosque Seco. Fase II. Informe Final. Herbario Loja. Proyecto Bosque Seco, Loja, EC, Universidad Nacional de Loja, Ecuador. 144 p.
- Hills DM, Mortiz C.** *Molecular Systematics*. Sinauer Associates, INC Publishers. Sunderland, Massachusetts. USA. 1990; 238 p.
- Iglesias, L. y García, J.** 1999. Principales avances en el estudio de la diversidad genética en árboles mediante el uso de marcadores moleculares. *Foresta Veracruzana* 1 (2): 51-56.
- INIAP** 2004, Servicios de Laboratorio de Biología molecular. Informe de Caracterización molecular de 41 híbridos de cacao productivos tolerantes a enfermedades y con sabor arriba. Quito Ecuador. 20p
- INIAP,** 2010. Caracterización molecular de las colecciones de especies forestales (Amarillo, Bálsamo y Moral Fino) del INIAP mediante marcadores RAPDs. Informe técnico. Departamento de Biotecnología, Estación Experimental Santa Catalina, Quito, Ecuador. 27p.

- Innis, M.;** Gelfand, D.; J. Sninsky; T. White. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, US. Academic Press. 482p.
- Klimbunga, S;** Siludjai, D; Tassanakajon A; Jarayabhand P, Menasveta, P 2001 3: 428-438.
- Klitgaard, B;** Lozano, P; Aguirre, Z; Merino, B; Aguirre, N; Delgado, T; Elizalde, F; 1999. Análisis florístico y estructural del Bosque “el Tundo” Sozoranga. Herbario Loja. Loja, EC, Universidad Nacional de Loja 3: 1–24.
- Lerceteau, E.,** R. Robert, V. Pe´ Tlard, and D. Crouzillat. 1997. Evaluation of the extent of genetic variability among *Theobroma cacao* accessions using RAPD and RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 95:10–19.
- Liu ZJ;** Cordes, JF. 2004. DNA marker technologies and their applications in aquaculture genetics. 238: 1-37.
- Liu, K., & Muse, S.** 2005. Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. Bioinformatics: 21(9): 2128-2129.
- Little, E;** Dixon, R. 1983. Árboles Comunes de la Provincia de Esmeraldas. Esmeraldas, EC. 502 p.
- López V, Y.E.** 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Turrialba,CR,CATIE.
- Lu, M.Z.;** Wang, X. R; Szmidt, A. E. 1997. Molecular properties of RAPDs in *Pinus sylvestris* L. in their implications for genetic analysis. For. Gen. 4: 227-234.
- Mendoza-Herrera,A.;** y Simpson.J. 1997. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avance y Perspectiva. Hemeroteca Virtual Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES).
- http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/avanpers/ene97/vol1608/s ec_2.html.

- Michiels** A, Endea V, Tuckerb M, Liesbet V, Laerea A. Extraction of high-quality genomic DNA from latex-containing plants. *Analytical Biochemistry*. USA. 2003; **1**, 85-89.
- Moen**, T; Agresti, JJ; Cnaani, A; Moses, H; Famula, TR; Hulata, G; Gall, GAE; May. B.2004. Uso de marcadores moleculares , res. 35: 893-094.
- Montaño**, K; Villalpando, E; Vargas, F. 2006. AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y su aplicación en la Acuicultura. Caracas, VE, INTERCIENCIA-ASOCIACIÓN INTERCIENCIA. p 563-569.
- Morillo**, E. 2000. Protocolos del Laboratorio de Marcadores Moleculares. Quito, EC, INIAP, DENAREF. p.17-20.
- Mueller**, UG; y Wolfenbargen, LL; 1999. AFLP genotyping y fingerprinting. *Trends Ecol. Evol.* 14: 389-394.
- Muluvi**, GM; Sprent JI, Soranzo N, Provan J, Odee D, Folkard G, Mcnicol JW, Powell W (1999). Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of variation genetic. in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology* 8: 463-470.
- Neale**, D.B; Sederof, R.R. 1992. Genome mapping in pines takes shape. *Probe.* 1: 1-3.
- Namkoong**, G; and Koshy, M; 2001. Application of genetic markers to forest tree species. Draft report to IPGRI of the project "Developing decision-marking strategies on priorities for conservation and use of forest genetic resources". Oxford, UK, IPGRI.
- Ortega**, F; Ballesteros, M; Lastra, M; Monserrat, J; Muiño, M; Prieto, A; Reyes, E. 2001. Texto ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética. Tema 11. Preparación de muestras, extracción y análisis de ácidos nucleicos. Madrid, ES, HARCOURT. p. 117-139.
- Ohsaki**, A.1999. "Microanalysis of a selective potent anti-Helicobacter pylori compound in a Brazilian medicinal plant, Myroxylon peruiferum and the activity of analogues. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*; 9(8): 1109-12.
- Page** R. 2008. TreeView 1.6.1.6. Disponible en Internet en la dirección <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/rod.html>

- Peña, D.** 2007. Estudio de la diversidad genética de caricaceae en el sur del país mediante la técnica de RAPD. Electroforesis. Tesis de maestría en biotecnología biología molecular e Ingeniería genética. Guayaquil, EC, Universidad de Guayaquil. p 11-12
- Philips-Mora, W. Rodriguez, R. Fritz.** 1995. Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones, y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Unidad de Biotecnología y Unidad de Recursos Filogenéticos. Turrialba, CR, CATIE. Informe Técnico N-° 252. p 87.(Informe técnico N°- 252: p. 87
- Ramos, L. Cevallos, O. Carranza, M. Veliz, y B. Dolores, M.**2004. Modulo de Biotecnología. Gel de Electroforesis. Modulo I. Quevedo, EC, Universidad Técnica Estatal de Quevedo. p 248.
- Rohlf, J;** 2002. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. New York, US, Department of Ecology and Evolution State University of New York.
- Sharma, SK; Knox MR, Ellis Thn** (1996). AFLP analysis of the diversity and phylogeny of *Lens* and its comparison with RAPD analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 93: 751-758 variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology* 8: 463-470.
- Somma, M;** S-f. Análisis de la presencia de organismos genéticamente modificados en muestras de alimentos. Extracción y Purificación de ADN. Sección #4 (en línea).Europa..Disponibile en [http://gmotraining.jrc.it/docs/Manu al%20ES/ Sesion 4.pdf](http://gmotraining.jrc.it/docs/Manu%20al%20ES/Sesion%204.pdf).
- Templeton, A and Lawrence, J.** 1988. FRAG-LENGTH III: algorithm for the calculation of molecular weights. Software distributed by the autors.
- Valverde, F.**1991 Estado actual de la vegetación natural de la Cordillera Chongon-Colonche. Guayaquil, EC, Universidad de Guayaquil.
- Welsch, J;** and McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Researcher* 18 (24): 7213-7218.
- Weising, K.;** Nybom, H.;; Wolf, K.;; Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Ratón, Florida,US, CRC Press Incl.

Williams, JKG; Kubelik, AR; Livak, KJ; Rafalski, JA; and Tingey, SV. 1990.
DNA
Polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic
markers. Nucleic Acid Research 18 (24). 6531-6535.

Wu, J; Krutovskii, K.V; Strauss, S.H. 1999. Nuclear DNA diversity, population
differentiation and phylogenetic relationships in the California closed-cone
pines based on RAPDs and allozyme markers. Genome. 41: 893-908.

Comunicaciones Personales

Ing. M.Sc. Ricardo Limongi: Técnico Investigador de la Estación Experimental
"Portoviejo". Responsable del Programa de Forestería del Litoral Ecuatoriano.
Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Director
del Proyecto: "Preservación de tres especies maderables nativas amenazadas
en la ecorregión del bosque seco del litoral ecuatoriano". PIC 2006-2-329

APÉNDICE

APÉNDICE 1. Maceración de las muestras foliares con Nitrógeno Líquido.



APÉNDICE 2. Proceso de extracción de ADN con el Kit Comercial.



APÉNDICE 3. Protocolo de extracción de ADN **Colombo et al. (1998).**

Buffer de extracción:

100 Tris pH 8
20 mM EDTA
2,8 % CTAB
1.3 mM NaCl
0,2 % mM B-Mercaptoetanol
1% PV

Primeramente se toman 400 mg de muestra foliar liofilizada, las mismas que fueron previamente maceradas con nitrógeno líquido **Apéndice 1**, estas se homogenizan en un tubo eppendorf con 800 ul de buffer de extracción (CTAB) . Posteriormente se incuban las muestras a 65 °C por 2 horas. Este proceso se lo realiza agitando las muestras cada 30 minutos. Después de haber incubado las muestras, se centrifuga a 13000 rpm por 10 minutos. Luego se recupera el sobrenadante 500 ul y se enraza a 700 ul con el buffer CTAB (200 ul) para luego adicionar 700 ul de cloroformo isoamilalcohol (24:1) y agitarlo por inversión. Después de haber agitado por inversión, se vuelve a centrifugar a 14000 rpm por un lapso de 5 minutos. Luego se captura el sobrenadante y se vuelve adicionar 700 ul de cloroformo isoamilalcohol para nuevamente mezclarlo por inversión. Después se adicionan 800 ul de isopropanol y se vuelve a centrifugar a 12000 rpm por 15 minutos. Luego de haber centrifugado las muestras se eliminan el isopropanol y se procede a lavar con alcohol al 70% para posteriormente secar las muestras y resuspender en 100 ul de TE mas 1 ul de RNAsa. Por último, después de todo este proceso se colocan las muestras en baño maría a 65°C por un lapso de 10 minutos.

APÉNDICE 4. Protocolo de extracción de ADN **Doyle & Doyle (1991).**

Buffer de extracción:

Tris-HCl pH.8.0 100 mM
EDTA 20 mM
CTAB (2%)
NaCl 1.4M
B-Mercaptoetanol 2%
1% PV

En este protocolo se usaron 300mg de tejido foliar macerado (seco y fresco) **Apéndice 1** los cuales fueron puestos en tubos de microcentrífuga (de 2 ml) con 700 µl de buffer de extracción e incubados a 65°C por 30 min. Mezclando por inversión cada 15 min. A estas muestras se les añadió 750 µl de cloroformo: alcohol isoamilico y fueron centrifugadas por 5 min a 8000 rpm. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo, se añadieron 2/3 de volumen de isopropanol frío y se incubó a -20°C durante toda la noche. Las muestras fueron centrifugadas a 15000 rpm durante 5 min, posteriormente el *pellet* fue lavado con buffer de lavado (etanol 76%, acetato de amonio 10mM), centrifugado a 8000 rpm durante 10 min. y secado a temperatura ambiente. El ADN fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (Tris – HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 50 mM pH 8,0).

APÉNDICE 5. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS Y RENDIMIENTO DE ADN**AMARILLO DE GUAYAQUIL (75 Acciones)**

Código EELS	CÓDIGO DNB	N° DE ÁRBOL	Concentración ADN	Rendimiento ug
GCBCOP101	A1	1	150	15
GCBCOP104	A2	11	150	15
GCBCOP202	A3	34	150	15
GCBCOP204	A4	43	150	15
GCBCOP207	A5	53	150	15
GCBCOP2010	A6	63	150	15
GJUCOP303	A7	71	150	15
GJUCOP304	A8	74	150	15
GJUCOP309	A9	84	100	10
GPECOP403	A10	97	100	10
GPECOP405	A11	103	100	10
GPECOP411	A12	111	100	10
GMCHCOP503	A13	116	150	15
GMCHCOP504	A14	118	150	15
GMCHCOP510	A15	125	150	15
GPECOP602	A16	130	150	15
GPECOP607	A17	146	300	30
GBOCOP701	A18	157	200	20
GBOCOP703	A19	164	200	20
MJICOP2201	A20	221	100	10
MJICOP2209	A21	240	150	15
MPPGCOP2108	A22	189	150	15
MPPGCOP2109	A23	193	100	10
MPPGCOP2110	A24	196	100	10
MIJCOP2211	A25	246	100	10
MLSGCOP2404	A26	259	150	15
MLSGCOP2408	A27	267	150	15
MLSGCOP2411	A28	275	100	10
MLSGCOP2413	A29	282	150	15
MSIPCOP2504	A30	294	150	15
MSIPCOP2509	A31	307	200	20
MSIPCOP2511	A32	313	200	20
MSAOCOP2301	A33	198	200	20
MSAOCOP2303	A34	202	150	15
LMACOP1002	A35	320	150	15
LMACOP1004	A36	322	100	10
EOPÑCOP6105	A37	VIVERO	150	15

EOPÑGCOP6402	A38	VIVERO	200	20
EOPÑGCOP6403	A39	VIVERO	200	20
EOPYCOP101	A40	VIVERO	300	30
EOPYCOP104	A41	VIVERO	200	20
EOLVCOP6701	A42	VIVERO	200	20
EOZRM COP6501	A43	VIVERO	100	10
EECOP9101	A44	VIVERO	300	30
EECOP9102	A45	VIVERO	100	10
EECOP9105	A46	VIVERO	150	15
EOEGCOP6301	A47	363	100	10
MCBCOP2804	A48	VIVERO	100	10
EOPÑCOP6206	A49	362	100	10
GCBCOP114	A50	VIVERO	300	30
MCBCOP2801	A51	VIVERO	100	10
MPCHCOP2901	A52	VIVERO	100	10
LPINCOP4414	A53	VIVERO	300	30
LZACOP4406	A54	VIVERO	300	30
LMACOP4104	A55	VIVERO	200	20
LMACOP4105	A56	VIVERO	100	10
LCECOP4701	A57	VIVERO	100	10
LZACOP4407	A58	VIVERO	100	10
LPINCOP4411	A59	VIVERO	100	10
EOLVCOP6702	A60	VIVERO	100	10
EOLVCOP6703	A61	VIVERO	100	10
EOPÑCOP202	A62	VIVERO	100	10
MPTCOP103	A63	VIVERO	100	10
LPINCOP4412	A64	VIVERO	100	10
LPINCOP4413	A65	VIVERO	100	10
LMACOP4111	A66	VIVERO	100	10
LMACOP4112	A67	VIVERO	300	30
LCECOP4702	A68	VIVERO	100	10
MCMOCOP3001	A69	VIVERO	100	10
MPBGCOP2604	A70	VIVERO	300	30
EOPÑCOP204	A71	VIVERO	300	30
EECOP9104	A72	VIVERO	200	20
EECOP9106	A73	VIVERO	100	10
EECOP9103	A74	VIVERO	100	10
LMACOP4106	A75	VIVERO	100	10

APÉNDICE 6. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS Y RENDIMIENTO DE ADN**BÁLSAMO (24 Acciones)**

CÓDIGO EELS	Nº DE ÁRBOL	Código DNB	Concentración	RENDIMIENTO ug
AMZMPP101	145	B1	8,08	0,8
GCBMPP201	1	B2	4,36	0,4
GPEMPP101	18	B3	29,2	2,9
GPEMPP106	50	B4	21	2,1
GPEMPP107	57	B5	13,92	1,4
GCBMPP204	37	B6	17,04	1,7
MCHCMPP2102	68	B7	13,24	1,3
MCHCMPP2104	83	B8	17,64	1,8
MSIPMPP2201	107	B9	7,64	0,8
MLCMPP2301	86	B10	7,64	0,8
MLCMPP2303	98	B11	11,64	1,2
LPCMPP4101	110	B12	24,16	2,4
LCTMPP4801	118	B13	16,92	1,7
LCTMPP4802	120	B14	4,48	0,4
LCTMPP4804	125	B15	6,6	0,7
LSGMPP4901	129	B16	1,98	0,2
LCTMPP5001	135	B17	18,32	1,8
EEMPP101	144	B18	24	2,4
MLCMPP2304	105	B19	12,8	1,3
LSGMPP4902	VIVERO	B20	12,2	1,2
MCHCMPP2101	61	B21	17,88	1,8
GPEMPP102	VIVERO	B22	30,08	3,0
BALSAMO	VIVERO	B23	12,2	1,2
MSVMPP3001	VIVERO	B24	24,16	2,4

APÉNDICE 7. CODIFICACIÓN DE MUESTRAS Y RENDIMIENTO DE ADN**MORAL FINO (21 Acciones)**

Código EELS	CODIGO DNB	N° DE ÁRBOL	Concentración	RENDIMIENTO ug
MPCHMTP2101	M1	5	35,2	3,5
MPCHMTP2104	M2	6	19,12	1,9
MPCHMTP2105	M3	15	35,12	3,5
MPCHMTP2103	M4	18	18,32	1,8
MPCHMTP2106	M5	24	38,32	3,8
MPCHMTP2107	M6	26	27,76	2,8
MPCHMTP2108	M7	31	28,56	2,9
MSIPMTP2501	M8	35	57,6	5,8
MJUMTP2601	M9	37	21,8	2,2
LPMMP4104	M10	40	32,44	3,2
LPMMP4105	M11	49	5,92	0,6
LPMMP4106	M12	50	48,8	4,9
LGIMTP4207	M13	54	40,4	4,0
LRLEMTP8101	M14	61	22,36	2,2
LRLEMTP8102	M15	65	47,6	4,8
LRLEMTP8103	M16	73	24,96	2,5
LRLEMTP8104	M17	75	42,4	4,2
LRLEMTP8105	M18	79	66	6,6
LRPPMTP8201	M19	85	58,4	5,8
LRPPMTP8202	M20	93	33,16	3,3
CLMMTP10101	M21	96	18,48	1,8