



# **UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

## **FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**

### **CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL**

Proyecto de Investigación previo a  
la obtención del título de Ingeniero  
Forestal

#### **TEMA:**

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES PROCEDENCIAS DE COSTA  
RICA DE *Tectona grandis* L. f. (TECA), MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES  
MOLECULARES RAPD.

#### **AUTOR:**

**Quintana Rico Rodolfo Fernando**

#### **DIRECTOR:**

**Dr. José Enrique Nieto Rodríguez**

**Quevedo – Los Ríos – Ecuador**

**2020**

## **DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS**

Yo, **Rodolfo Fernando Quintana Rico**, declaro bajo juramento que el trabajo aquí descrito es de mi autoría; que este no ha sido previamente presentado para ningún trabajo de grado o calificación profesional y que he consultado las referencias bibliográficas que se incluyen en este documento.

La Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, puede hacer uso de los derechos correspondientes a este trabajo, según lo establecido por la Ley de Propiedad Intelectual, por su reglamento y por la normatividad institucional vigente.

---

**Rodolfo Fernando Quintana Rico**

**C.C. # 1205363482**

## **CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

El suscrito, **Dr. José Enrique Nieto Rodríguez**, Docente de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, certifica que el Estudiante **Rodolfo Fernando Quintana Rico**, realizó el Proyecto de Investigación de grado titulado “**Análisis la diversidad genética de tres procedencias de Costa Rica de *Tectona grandis* L. f (teca), mediante el empleo de marcadores moleculares RAPD**”, previo a la obtencion del título de **Ingeniero Forestal**, bajo mi dirección, habiendo cumplido con todas las disposiciones reglamentarias establecidas para el efecto.

f. \_\_\_\_\_

**Dr. José Enrique Nieto Rodríguez**

**DIRECTOR DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

## CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO

**URKUND**

### Urkund Analysis Result

Analysed Document: Rodolfo\_Quintana\_analisis\_diversidad\_genetica\_teca.docx  
(D64224446)

Submitted: 2/21/2020 4:40:00 PM

Submitted By: rlopez@uteq.edu.ec

Significance: 0 %

Sources included in the report:

<https://core.ac.uk/download/pdf/72020921.pdf>  
<https://docplayer.es/74107931-Universidad-de-guayaquil-facultad-de-ciencias-agrarias-tesis-de-grado-previa-la-obtencion-del-titulo-de-ingeniero-agronomo.html>

Instances where selected sources appear:

2





**UNIVERSIDAD TÉCNICA ESTATAL DE QUEVEDO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AMBIENTALES**

**CARRERA DE INGENIERÍA FORESTAL**

**PROYECTO DE INVESTIGACIÓN**

**“ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE TRES PROCEDENCIAS DE COSTA RICA DE *Tectona grandis* L. f. (TECA), MEDIANTE EL EMPLEO DE MARCADORES MOLECULARES RAPD”.**

Presentado a la Comisión Académica como requisito previo a la obtención del título de Ingeniero Forestal

**APROBADO POR:**

---

Dr. Jaime Morante Carriel

PRESIDENTE DEL TRIBUNAL

---

Dr. Nicolás Cruz Rosero

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

---

Ing. Edwin Jiménez Romero

INTEGRANTE DEL TRIBUNAL

QUEVEDO – LOS RÍOS – ECUADOR

2020

## **AGRADECIMIENTO**

Quiero extender mi más sincero agradecimiento a las personas e instituciones involucradas en el desarrollo de esta investigación:

- A la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ), especialmente a la Facultad de Ciencias Ambientales y la Carrera de Ingeniería Forestal.
- Al Ing. Rolando López Tobar, coordinador de carrera y excelente profesor, cuya guía han sido muy importante a lo largo de este tiempo.
- Al Ing. Ángel Cedeño, por depositar en mí su confianza y su amistad y por ser también un importante participante de esta investigación al haberme brindado sus conocimientos.
- A Luis Fernando Vera, un gran amigo y ser humano, quien ayudó mucho en la culminación de este proyecto.
- A todo el personal docente de la carrera de ingeniería forestal, sobre todo al Ing. Rommel Crespo quien tiene toda mi estima y a quien considero un excelente profesor.
- A mis queridos amigos del Laboratorio de biotecnología de la UTEQ: Luis Vera, Maholy Loza, Víctor García, Jorge Rodríguez, Antonio Mendoza, Steven Loo, etc.
- A mis queridos amigos de carrera con quienes conviví estos años y que fueron parte de mi formación profesional.
- Al Instituto de Fomento al Talento Humano y al Senecyt, por hacerme parte de su grupo de becarios.

## **DEDICATORIA**

La presente investigación se la dedico:

A mis padres Cristina Rico y Mario Núñez quienes han sido parte de mi inspiración para nunca rendirme ante las dificultades, a mis hermanos Jonathan, Carlos y Matías, a mi abuela Emilia, a mis tías, primos y toda mi familia, también a mi amigo Christian Rodríguez que siempre estuvo ahí para alentarme y darme apoyo de todo tipo para nunca rendirme.

A todos muchas gracias.

## RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la diversidad genética de tres procedencias de *Tectona Grandis* (teca) provenientes de plantaciones ubicadas en la República de Costa Rica, cuyo material fue plantado en la Finca Experimental “La Represa” perteneciente a la UTEQ. Para realizar la evaluación, se extrajo ADN de teca usando tres protocolos diferentes y un kit de extracción, determinando la superioridad del protocolo Uyemoto *et al.* (1998) en concentración (76,25 ng/μl) y del Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012) en pureza (75%,) se consideró también la importancia de la pureza sobre la concentración del ADN en las extracciones, razón por la que se optó por el uso del kit para extraer el ADN de los individuos a evaluar. Se evaluaron cinco individuos por cada una de las procedencias a analizadas, resultando un total de 15 individuos utilizados para la extracción de su ADN, luego se realizó la evaluación de la diversidad genética mediante PCR usando oligonucleótidos RAPD de la casa Operon, entre los que se encuentran OPA 04, OPA 10, OPA 15, entre otros. Para la evaluación de dicha diversidad, los oligonucleótidos fueron usados en combinaciones de dos, los individuos evaluados demostraron estar emparentados en función de su localización, formándose tres grupos principales correspondientes a cada procedencia, mostraron niveles bajos de polimorfismos, que tuvieron un promedio de 57,33% entre las cinco combinaciones.

**Palabras claves:** Diversidad, evaluación, extracción de ADN, marcadores moleculares.



## ABSTRACT

This research aimed to assess the genetic diversity of three *Tectona Grandis* origins (teca) from plantations located in the Republic of Costa Rica, whose material was planted in the Experimental Finca "La Represa" belonging to the UTEQ. To perform the evaluation, tee DNA was extracted using three different protocols and an extraction kit, determining the superiority of the Uyemoto et al protocol. (1998) in concentration (76.25 ng/l) and the PureLink Genomic DNA DNA Extraction Kit (Invitrogen, 2012) in purity (75.00%), the importance of purity on DNA concentration in extractions was also considered, which was why the use of the kit to extract DNA from the individuals to be evaluated was also considered. Five individuals were evaluated for each of the sources to be analyzed, resulting in a total of 15 individuals used for the extraction of their DNA, then the evaluation of genetic diversity by PCR was performed using RAPD oligonucleotides of the Operon house, among which are OPA 04, OPA 10, OPA 15, among others. For the assessment of this diversity, oligonucleotides were used in combinations of two, the individuals evaluated proved to be related according to their location, forming three main groups corresponding to each source, showed low levels of polymorphs, which averaged 57.33% among the five combinations.

**Keywords:** Diversity, evaluation, DNA extraction, molecular markers.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

| <b>Temas</b>                                                                                            | <b>Pág.</b> |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| PORTADA .....                                                                                           | i           |
| DECLARACIÓN DE AUTORÍA Y CESIÓN DE DERECHOS .....                                                       | ii          |
| CERTIFICACIÓN DE CULMINACIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN.....                                         | iii         |
| CERTIFICACIÓN DEL REPORTE DE LA HERRAMIENTA DE PREVENCIÓN DE<br>COINCIDENCIA Y/O PLAGIO ACADÉMICO ..... | iv          |
| TRIBUNAL DE TESIS .....                                                                                 | v           |
| AGRADECIMIENTO .....                                                                                    | vi          |
| DEDICATORIA .....                                                                                       | vii         |
| RESUMEN .....                                                                                           | viii        |
| ABSTRACT .....                                                                                          | ix          |
| ÍNDICE DE CONTENIDOS.....                                                                               | x           |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                                                                   | xiii        |
| ÍNDICE DE FIGURAS .....                                                                                 | xiv         |
| INTRODUCCIÓN.....                                                                                       | xvi         |

### CAPÍTULO I. CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN

|                                                 |   |
|-------------------------------------------------|---|
| 1.1. Problematicación de la investigación. .... | 2 |
| 1.1.1. Planteamiento del problema. ....         | 2 |
| Diagnóstico.....                                | 2 |
| Pronóstico. ....                                | 2 |
| 1.1.2. Formulación del problema. ....           | 3 |
| 1.1.3. Sistematización del problema. ....       | 3 |
| 1.2. Objetivos. ....                            | 3 |
| 1.2.1. General. ....                            | 3 |
| 1.2.2. Específicos .....                        | 3 |
| 1.3. Hipótesis de la investigación. ....        | 3 |
| 1.4. Justificación.....                         | 4 |

### CAPÍTULO II. FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN

|                                                   |   |
|---------------------------------------------------|---|
| 2.1. Fundamentación conceptual. ....              | 6 |
| 2.1.1. Descripción taxonómica de la especie. .... | 6 |

|                                                                               |    |
|-------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.1.2.Descripción botánica de la especie. ....                                | 6  |
| 2.1.6.Reacción en cadena de la polimerasa.....                                | 10 |
| 2.1.7.Marcadores moleculares.....                                             | 10 |
| 2.1.8.Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.....                         | 11 |
| 2.2. Fundamentación referencial. ....                                         | 12 |
| 2.2.1.Diversidad genética. ....                                               | 12 |
| 2.2.2.Diversidad genética en teca.....                                        | 12 |
| 2.2.3.Diversidad de los recursos genéticos forestales. ....                   | 13 |
| 2.2.4.Escases de los recursos genéticos forestales. ....                      | 14 |
| 2.2.5.Poblaciones de escasa diversidad genética para producción forestal..... | 14 |

### CAPÍTULO III. METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

|                                                                                 |    |
|---------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.1. Materiales y métodos.....                                                  | 17 |
| 3.1.1.Localización de la investigación. ....                                    | 17 |
| 3.1.1.1. Fase de campo. ....                                                    | 17 |
| 3.1.1.2. Fase de laboratorio. ....                                              | 17 |
| 3.2. Tipo de investigación. ....                                                | 17 |
| 3.3. Métodos de investigación.....                                              | 17 |
| 3.4. Fuentes de recopilación de información.....                                | 18 |
| 3.4.1.Fuentes primarias ....                                                    | 18 |
| 3.4.2.Fuentes secundarias.....                                                  | 18 |
| 3.5. Diseño de la investigación.....                                            | 18 |
| 3.5.1.Recolección de las muestras. ....                                         | 18 |
| 3.5.2. Validación de un protocolo de extracción de ADN. ....                    | 19 |
| 3.5.2.1. Análisis estadístico.....                                              | 19 |
| 3.5.3.Extracción y purificación de ADN.....                                     | 20 |
| 3.5.3.1. Protocolo Uyemoto <i>et al.</i> (1998).....                            | 20 |
| 3.5.3.2. Protocolo Doyle y Doyle (1987). ....                                   | 20 |
| 3.5.3.3. Protocolo Dellaporta <i>et al.</i> (1983).....                         | 21 |
| 3.5.3.4. Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012). .... | 22 |
| 3.5.4.Evaluación de la calidad de ADN obtenido por protocolo. ....              | 23 |
| 3.5.6.Análisis de las muestras a través de RAPD. ....                           | 24 |
| 3.5.6.1. Selección de oligonucleótidos. ....                                    | 24 |

|                                        |    |
|----------------------------------------|----|
| 3.5.6.2. Componentes de la PCR.....    | 26 |
| 3.5.6.3. Programa de PCR .....         | 27 |
| 3.5.7. Análisis estadístico.....       | 27 |
| 3.5.8. Análisis de conglomerados ..... | 29 |
| 3.6.1. Materiales de campo. ....       | 29 |
| 3.6.3. Equipo de laboratorio.....      | 30 |

#### CAPÍTULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

|                                                                                  |    |
|----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.1. Resultados.....                                                             | 32 |
| 4.1.1. Evaluación de los protocolos de extracción de ADN. ....                   | 32 |
| 4.1.2. Evaluación de la calidad de ADN extraído por cada protocolo. ....         | 34 |
| 4.1.4. Análisis genético usando amplificación aleatoria de ADN polimórfico. .... | 36 |
| 4.1.4.1. Determinación de polimorfismo. ....                                     | 36 |
| 4.1.5. Agrupamiento para determinar la diversidad genética .....                 | 40 |
| 4.2. Discusión .....                                                             | 42 |

#### CAPITULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

|                            |    |
|----------------------------|----|
| 5.1. Conclusiones.....     | 45 |
| 5.2. Recomendaciones ..... | 46 |

#### CAPÍTULO VI. BIBLIOGRAFÍA

|                             |    |
|-----------------------------|----|
| 6.1. Literatura Citada..... | 48 |
|-----------------------------|----|

#### CAPITULO VII. ANEXOS

|                   |    |
|-------------------|----|
| 7.1. Anexos ..... | 52 |
|-------------------|----|

## ÍNDICE DE TABLAS

|                                                                                                                                                       |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Tabla 1. Esquema del análisis de varianza. ....                                                                                                       | 19 |
| Tabla 2. Escala porcentual para medir la calidad de ADN.....                                                                                          | 23 |
| Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las tres procedencias en esta investigación.....                                             | 25 |
| Tabla 4. Reactivos usados para la obtención de la PCR.....                                                                                            | 26 |
| Tabla 5. Programa de PCR. ....                                                                                                                        | 27 |
| Tabla 6. Combinaciones de oligonucleótidos junto con el número de bandas amplificadas, sus polimorfismos y resultados promedio de estos últimos. .... | 36 |

## ÍNDICE DE FIGURAS

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Escala de concentraciones y pares de base de 1Kb DNA Ladder para la estimación de la concentración de ADN.....                                                                                                                                                                                                                                                                                                | 24 |
| Figura 2. Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Uyemoto et al. (1998). ....                                                                                                                                                                                                                                                                               | 32 |
| Figura 3. Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Doyle & Doyle (1987). ....                                                                                                                                                                                                                                                                                | 33 |
| Figura 4. Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Dellaporta et al. (1983). ....                                                                                                                                                                                                                                                                            | 33 |
| Figura 5. Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012). ....                                                                                                                                                                                                                                              | 33 |
| Figura 6. Promedio de la calidad de ADN obtenido por cada protocolo, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ....                                                                                                                                                                                                                                                            | 34 |
| Figura 7. Promedio de concentración de ADN obtenido por cada protocolo, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ). ....                                                                                                                                                                                                                                                         | 35 |
| Figura 8. Productos de PCR obtenidos de la combinación M07 y A01, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda. ....                                                                                                                                                                                                                                                        | 37 |
| Figura 9. Productos de PCR obtenidos de la combinación OPA 04 y PLAT, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda. ....                                                                                                                                                                                                                                                    | 38 |
| Figura 10. Productos de PCR obtenidos de la combinación M 07 y OPA 10, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 38 |
| Figura 11. Productos de PCR obtenidos de la combinación OPC 15 y A 01, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 39 |
| Figura 12. Productos de PCR obtenidos de la combinación OPA 15 y M 04, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda. ....                                                                                                                                                                                                                                                   | 40 |
| Figura 13. Dendrograma generado a partir de datos RAPD, usando las tres procedencias en estudio, las distancias evolutivas se calcularon mediante el método UPGMA, el análisis de conglomerados se construyó usando el método de Nei (1978). Los individuos con la codificación SC corresponden a la procedencia Santa Cruz, Los de codificación PA, Parrita y los individuos con la codificación PI, Pillangosta. .... | 41 |

## CÓDIGO DUBLÍN

|                                         |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
|-----------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Título:</b>                          | “Análisis la diversidad genética de tres procedencias de Costa Rica de <i>Tectona grandis</i> L. f (teca), mediante el empleo de marcadores moleculares RAPD”                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
| <b>Autor:</b>                           | Rodolfo Fernando Quintana Rico                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
| <b>Palabras claves:</b>                 | Tectona grandis RAPD, diversidad genética, filogenetica                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |
| <b>Fecha de publicación:</b>            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| <b>Editorial:</b>                       | UTEQ; FCAMB; Carrera de Ingeniería Forestal, 2020                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
| <b>Resumen:</b><br>(hasta 300 palabras) | <p>La presente investigación tuvo como objetivo evaluar la diversidad genética de tres procedencias de <i>Tectona. Grandis</i> (teca) provenientes de plantaciones ubicadas en la República de Costa Rica, cuyo material fue plantado en la Finca Experimental “La Represa” perteneciente a la UTEQ. Para realizar la evaluación, se extrajo ADN de teca usando tres protocolos diferentes y un kit de extracción, determinando la superioridad del protocolo Uyemoto et al. (1998) en concentración (76,25 ng/μl) y del Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012) en pureza (75,00%,) se consideró también la importancia de la pureza sobre la concentración del ADN en las extracciones, razón por la que se optó por el uso del kit para extraer el ADN de los individuos a evaluar. Se evaluaron cinco individuos por cada una de las procedencias a analizadas, resultando un total de 15 individuos utilizados para la extracción de su ADN, luego se realizó la evaluación de la diversidad genética mediante PCR usando oligonucleótidos RAPD de la casa Operon, entre los que se encuentran OPA 04, OPA 10, OPA 15, entre otros. Para la evaluación de dicha diversidad, los oligonucleótidos fueron usados en combinaciones de dos, los individuos evaluados demostraron estar emparentados en función de su localización, formándose tres grupos principales correspondientes a cada procedencia, mostraron niveles bajos de polimorfismos, que tuvieron un promedio de 57,33% entre las cinco combinaciones.</p> |
| <b>Descripción:</b>                     | 69 hojas, dimensiones 29 x 21 cm                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| <b>URL:</b>                             |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |

## INTRODUCCIÓN

La siembra de bosques de *Tectona grandis* (conocida como teca) se ha incrementado significativamente, desde pequeños silvicultores hasta grandes haciendas donde funcionan como una inversión a largo plazo. Esto ha ocurrido en nuestro país por la buena capacidad de adaptación de esta especie al clima del litoral ecuatoriano, la excelente calidad de la madera, propia de la que el mercado maderero exige, a su precio relativamente bueno en el exterior, pues la gran mayoría de esta madera es exportada (Vaca, 2015).

Los Ríos y Guayas son las principales provincias que poseen una alta superficie de plantaciones de teca, sobre todo en los cantones Quevedo y Balzar. Sin embargo, las provincias de Manabí y Esmeraldas también tienen una cantidad sustancial de plantaciones de esta especie tan importante a nivel comercial. El hecho de que el volumen de madera por hectárea pueda llegar a 126.84 m<sup>3</sup> con una densidad de 200 árboles hace bastante atractiva a esta especie para el mercado maderero (Vaca, 2015).

En Ecuador, la variabilidad genética ha sido un tema poco estudiado en especies vegetales, sobre todo en especies forestales. La diversidad genética se ve reflejada en las diferencias de caracteres que se evidencian en las secuencias de ADN que poseen diferencias mínimas (Brito, 2015), las variantes de estas secuencias pueden resultar en diferentes secuencias de aminoácidos y, por lo tanto, de proteínas. Dicha variación puede ocasionar alteraciones bioquímicas o morfológicas que causan diferencias en términos reproductivos, de comportamiento e incluso de supervivencia (Alia *et al*, 2003).

La variabilidad genética en especies forestales como la teca ha sido evaluada anteriormente en el Ecuador por Nieto-Rodríguez *et al.* (2013) quienes determinaron que varias poblaciones del litoral del país posiblemente tienen como origen la población de otro grupo establecido en el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) de Quevedo, el cual es además la primera población de esa especie introducida al Ecuador desde Costa Rica a través de semillas. En este proyecto se evaluó la diversidad genética de tres procedencias pertenecientes a una plantación de teca ubicada en la Finca Experimental “La Represa”, en Quevedo, de manera intra e interpoblacional, con la finalidad de saber cuan emparentadas están dichas procedencias.



**CAPÍTULO I**  
**CONTEXTUALIZACIÓN DE LA INVESTIGACIÓN**

## **1.1. Problematización de la investigación.**

### **1.1.1. Planteamiento del problema.**

La variabilidad genética de las especies forestales ha sido un factor poco estudiado en Ecuador. Dicho factor ha estado ligado a contadas especies de valor comercial como la teca, pues debido al hecho de ser una especie cuyo cultivo va aumentando se requiere conocer la genética de esta a fin de establecer plantaciones cuya diversidad sea alta, de modo que algunos riesgos como la presencia de plagas o ciertos factores adversos se vea reducida gracias a los genes que permiten resistir a dichos inconvenientes. Sin embargo, esto último no ha sido del todo posible debido a situaciones como la poca planificación forestal y el establecimiento de plantaciones provenientes de fuentes no certificadas y/o de diversidad genética pobre.

#### **Diagnóstico.**

Las procedencias por evaluar ya han sido diagnosticadas anteriormente, y se estableció que están emparentadas, pues las tres tienen como fuente de origen diferentes plantaciones ubicadas en Santa Cruz, Parrita, y Pillangosta, todas ubicaciones de la República de Costa Rica. En función de lo descrito, es necesario complementar estudios que conduzcan a evaluar la diversidad intra e interpoblacional de las procedencias citadas.

#### **Pronóstico.**

La ejecución de esta propuesta permitirá calcular las distancias genéticas existentes entre las diferentes procedencias mediante matrices y un análisis jerárquico de varianza molecular, que a su vez permitirán establecer un dendrograma de poblaciones, determinando así cuán alejadas están genéticamente las procedencias.

### **1.1.2. Formulación del problema.**

¿Existe suficiente diversidad genética entre las diferentes procedencias para establecer un rodal semillero según este parámetro?

### **1.1.3. Sistematización del problema.**

¿Los resultados que otorgan los dendrogramas son consistentes?

¿Las procedencias poseen alta diversidad genética entre ellas?

## **1.2. Objetivos.**

### **1.2.1. General.**

Analizar la diversidad genética de teca de tres procedencias de Costa Rica, mediante el empleo de marcadores moleculares RAPD.

### **1.2.2. Específicos**

- Validar un protocolo de extracción y purificación de ADN en *T. grandis*.
- Realizar un análisis genético utilizando amplificación aleatoria de ADN polimórfico como marcadores moleculares.
- Conocer la diversidad genética intra e interpoblacional en cada procedencia analizada.

## **1.3. Hipótesis de la investigación.**

En el presente trabajo se empleará la siguiente hipótesis:

H<sub>0</sub>: Existe alta variabilidad genética entre las procedencias.

H<sub>1</sub>: Existe baja variabilidad genética entre las procedencias.

## **1.4. Justificación**

Pocas poblaciones de teca han sido estudiadas genéticamente con la finalidad de conocer su potencial forestal basado en el supuesto de que, a mayor variabilidad, mayor capacidad de resistencia a factores adversos. El presente trabajo contribuirá al conocimiento de las distancias genéticas existentes entre las procedencias, además de proveer un juicio correcto desde el punto de vista genético en referencia a la factibilidad o no del establecimiento de un rodal semillero con semillas de las plantaciones a las cuales las procedencias pertenecen.

Hay que destacar que el mejoramiento genético forestal tiene en muchos casos como punto de partida estudios como este, que buscan determinar la cantidad de características genéticas dentro de especies específicas, con la finalidad de seleccionar individuos cuyas características sean sobresalientes en términos económicos, como mejor producción de madera, crecimiento más rápido, resistencia a ciertos patógenos, etc.; ambientales como mayor capacidad de captura de carbono o mayores niveles de floración y fructificación, que favorecerán a ciertos animales e incluso humanos.

Dentro del manejo de los recursos genéticos forestales es fundamental el conocimiento de la diversidad genética de las especies, puesto que de esto se desprende la obtención de un manejo de especies con características que seguramente fueron preseleccionadas en el mejoramiento genético, e incluso la obtención del manejo de especies con características menores pero que con un manejo adecuado rinden adecuadamente.

Además de lo antes dicho, hay que recalcar la importancia del establecimiento de plantaciones forestales cuyas fuentes sean genéticamente diversas, pues esto asegura, entre otras cosas, mayor capacidad de adaptación y sobrevivencia, resaltando así la importancia de la diversidad.

## **CAPÍTULO II**

### **FUNDAMENTACIÓN TEÓRICA DE LA INVESTIGACIÓN**

## **2.1. Fundamentación conceptual.**

### **2.1.1. Descripción taxonómica de la especie.**

La teca presenta la siguiente descripción taxonómica (Fonseca, 2003):

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Clase:** Magnoliopsida

**Orden:** Lamiales

**Familia:** Vervenaceae

**Género:** Tectona

**Nombre científico:** *Tectona grandis* L. f

**Nombre común:** teca

### **2.1.2. Descripción botánica de la especie.**

#### **2.1.2.1. Fuste.**

El tronco o fuste es recto, con tendencia a bifurcarse o a ramificarse si crece de forma aislada (Fonseca, 2003). El fuste puede llegar a alcanzar hasta los 50 metros de altura en condiciones favorables (Cárcamo, 2003).

#### **2.1.2.2. Corteza.**

Esta suele tener un espesor de 1.2 mm, además es áspera, delgada, fisurada y posee un color café claro (Cárcamo, 2003).

#### **2.1.2.3. Copa.**

Cuando el árbol crece aislado, es común que exista bifurcación en el fuste, además de presentar una copa más amplia, ramas gruesas y bajas (Cárcamo, 2003).

#### **2.1.2.4. Hojas – peciolo.**

Cárcamo (2003) asegura que, al ser una especie caducifolia, la teca pierde sus hojas en época seca y las recupera en época lluviosa. Estas además son grandes, gruesas, al madurar poseen un color verde oscuro y cubren por completo el suelo.

#### **2.1.2.5. Flores.**

Florece a los 5 o 6 años en su hábitat de origen, pero en algunas zonas donde son exóticas pueden florecer a los 2 años. Normalmente con la llegada de las lluvias, sus flores se disponen en panículas erectas terminales y suelen ser numerosas, con pedicelos que miden de 0.9 a 4.5 mm y de brácteas grandes, foliáceas y con bractéolas numerosas. Las flores presentan un cáliz en forma de campana color amarillo verdoso con un estilo de color blanco amarillento que posee pubescencia de pelos ramificados (Blanco-Flórez *et al*, 2014).

#### **2.1.2.6. Fruto.**

Blanco-Flórez *et al.* (2014) expresan que el fruto suele madurar a los 120 días de fertilización y es subgloboso, tetrágono, aplanado, de un exocarpo delgado y ligeramente carnoso al estar fresco. Fonseca (2003), explica que este posee un endocarpo grueso y corrugado con cuatro celdas que encierran una o dos semillas de hasta 5 mm de largo.

#### **2.1.2.7. Condiciones de desarrollo.**

Esta especie puede crecer en condiciones climáticas de clima monzónico (tropical húmedo y cálido), caracterizado con una estación seca de 3 a 5 meses y una precipitación anual entre 1300 mm y 2500 mm. La temperatura óptima para el desarrollo de esta especie se encuentra entre 16 °C y 40 °C (Cárcamo, 2003).

#### **2.1.2.8. Origen y distribución.**

Blanco-Flórez *et al.* (2014) expresan que, siendo una especie nativa del sur de Asia (India, Myanmar, Tailandia y la República democrática Popular de Laos), Esta especie ha sido introducida a otras zonas con características climáticas similares como Java en Indonesia,

además de países de África tropical como Costa de Marfil, Nigeria, y Sierra Leona, entre otros. En Latinoamérica se encuentra en la mayoría de los países, estando desde México, pasando por varios países de Centroamérica y el Caribe como Costa Rica, Panamá, Trinidad y Tobago, hasta países de Suramérica como Ecuador, Colombia y Brasil.

### **2.1.3. Extracción de ADN.**

La extracción del ADN consiste en el aislamiento y la purificación de moléculas de ADN, basado en las características fisicoquímicas de las moléculas (Piñero, 2008).

Cornejo *et al.* (2014) expresan que con el tiempo y el avance de las tecnologías se han diseñado distintos protocolos que tienen como propósito obtener la cantidad y calidad de ADN correcta, sin embargo, los métodos tradicionales desarrollados en los años 50 aún son usados, requiriendo estos solventes orgánicos para separar las proteínas y demás compuestos presentes en las muestras del ADN. En general estos protocolos consisten en cinco etapas principalmente: homogenización del tejido, lisis celular, separación de proteínas y lípidos, precipitación y redisolución del ADN.

A partir de los años 90 se introdujeron al mercado, kits de extracción que usan matrices inorgánicas compactas cargadas positivamente y que son capaces de retener varios microgramos de ADN. Estos productos incluyen soluciones de lisis, unión y lavado, su utilidad radica en que han logrado reducir varios de estos procesos de días a solo horas (Cornejo *et al.*, 2014).

### **2.1.4. Concentración y pureza del ADN.**

12

Para la determinación de la concentración y pureza de una muestra de ADN, se utiliza espectrofotometría, basándose en la capacidad de absorbancia de un compuesto presente en una solución a una longitud de onda determinada. Así, la concentración de una muestra se calcula teniendo en cuenta el valor de absorbancia obtenido a una longitud de onda de 260 nm, mientras que, la relación de absorbancias  $A_{260}/A_{280}$  y  $A_{260}/A_{230}$  se usa para evaluar la pureza de las muestras (Salinas, 2010).



La relación A260/280 es muy estable y se considera que un ADN de pureza óptima tiene un valor entre 1.8-2.0. Un ADN de pureza aceptable debe tener al menos una relación A260/280 > 1.6. Un valor A260/280 < 1.6 indica una posible contaminación por compuestos aromáticos como fenoles y proteínas (Salinas, 2010).

Para la realización de estudios de genética molecular es importante disponer de protocolos rápidos, simples, económicos y reproducibles, para purificar ADN a partir de diferentes tipos de tejidos. Como no existe un protocolo universal, para aquello se han descrito diferentes protocolos para la extracción y purificación de ADN de diferentes especies a partir de tejidos específicos (Castro *et al.*, 2013). Salinas (2010) explica que la dificultad de la purificación del ADN está basada en el hecho de que cada muestra posee proteínas, lípidos y demás compuestos específicos, de modo que las concentraciones y tipos de reactivos a usarse deben diferir en función de la composición de las muestras.

#### **2.1.5. Electroforesis de ADN y geles de agarosa.**

La electroforesis ha sido útil para realizar estudios de análisis de ADN, además de aplicarse en estudios que incluyen proteínas y ARN, siendo actualmente fundamentales para investigaciones sobre biología molecular (Brito, 2015).

Según Klug *et al.* (2013) básicamente este proceso separa moléculas de una mezcla, haciéndola migrar bajo la influencia de un campo eléctrico. La mezcla a ser analizada se coloca en una sustancia porosa, normalmente gel de agarosa o gel de poliacrilamida. Según el estudio a realizarse, la sustancia a su vez se coloca en una solución conductora de electricidad. Si dos sustancias tienen la misma masa, la que tenga mayor carga neta migrará más rápido hacia el electrodo de polaridad opuesta.

Salinas (2010) expresa que la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (Porcentaje peso/volumen), permite la valoración de la integridad de la muestra de ADN. Cuando una muestra de ADN es integra, su perfil en una electroforesis en gel de agarosa se corresponde a una banda discreta. Según lo anteriormente expresado, se puede determinar el nivel de degradación de una muestra por la pérdida de definición de la banda predominante y el acompañamiento de una estela a lo largo del gel.

### **2.1.6. Reacción en cadena de la polimerasa.**

También conocida sencillamente como PCR, es una tecnología que permite amplificar una o varias copias de un fragmento de ADN, generando cientos o miles de copias de dicho fragmento. Actualmente es una técnica indispensable en laboratorios de medicina y biología, debido a la gran variedad de aplicaciones que tiene en diversas áreas que incluyen diagnóstico de enfermedades hereditarias, secuenciación de ADN, identificación de huellas genéticas, análisis funcional de genes, etc. (Joshi y Deshpande, 2011).

Dentro de la genética vegetal, la PCR ha sido usada ampliamente en muchos estudios que han incluido la variabilidad genética de poblaciones, la secuenciación de ADN y en muchas investigaciones que tienen la obligación de amplificar ADN que luego será estudiado y procesado en dichas investigaciones (Patel *et al.*, 2015).

En esencia, para la PCR se requiere de un ADN molde, cebadores (una secuencia corta de ADN de cadena simple), nucleótidos y ADN polimerasa, siendo esta última la enzima clave que utiliza el ADN molde para hacer una copia de esta mediante la incorporación de nucleótidos de forma secuencial. Los nucleótidos son los bloques de la nueva copia resultante, mientras los cebadores, al ser fragmentos cortos de ADN, dan especificidad a la reacción, mientras el ADN polimerasa usa a los cebadores como punto de inicio de la polimerización (Patel *et al.*, 2015).

### **2.1.7. Marcadores moleculares.**

También llamados marcadores genéticos, son compuestos biológicos, determinados por variaciones alélicas y usados normalmente como sondas experimentales o etiquetas para rastrear, entre otras cosas, células, núcleos, cromosomas y por supuesto genes (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). En esencia, estos son una secuencia de ADN con una ubicación conocida (locus), y asociado a un gen o un rasgo en particular de dicho gen (Kordrostami y Rahimi, 2015). Los marcadores moleculares se han usado para facilitar el estudio de la herencia y la variación en el ADN, tanto de plantas como animales y hongos (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015).

Estas herramientas biotecnológicas han sido consideradas como valiosas para el establecimiento de muchos cultivos alimenticios como el arroz (*Oryza sativa*), el trigo (*Triticum spp.*) y varias especies forrajeras, evidentemente los cultivos forestales en algunas partes del mundo no han sido la excepción. Los marcadores, que pueden provenir de cualquier clase de ADN como mutaciones, errores de replicación e incluso inserciones y deleciones, han sido ampliamente usados debido a su prevalencia y expresión en diferentes etapas de los organismos (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015).

#### **2.1.8. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico.**

Conocido por sus siglas en ingles RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), es un marcador molecular normalmente empleado en estudios de diversidad y mejoramiento genético, puesto que no requiere de ningún conocimiento de la secuencia de ADN para el gen a identificar, ya que, usando este marcador, los cebadores se unen en algún lugar de la secuencia de ADN, aunque es difícil determinar dicho lugar. Estos marcadores suelen ser fragmentos decaméricos (de 10 nucleótidos de longitud), obtenidos por PCR y provenientes de segmentos aleatorios de ADN genómico, siendo capaces de distinguir entre individuos genéticamente diferentes (Kumar y Gurusubramanian, 2011).

El principio de esta técnica está basado en un oligonucleótido corto al que se unen varios locus diferentes que luego se usan para amplificar secuencias aleatorias de una plantilla de ADN. Eso significa que el fragmento generado por PCR y amplificado depende de la longitud y el tamaño de la imprimación, como del gen objetivo. Se asume que la secuencia de ADN dada tendrá lugar en el genoma. Los productos amplificados obtenidos por este método se separan normalmente en geles de agarosa, con una concentración que va del 1.5 a 2.0% de concentración, y se visualizan por la coloración del bromuro de etidio (Chaudhari *et al.*, 2018).

Las principales ventajas de estos marcadores genéticos son: no requerir una presecuenciación de ADN, el hecho de que las bandas se generan mediante una cuidadosa selección de cebadores, se logra la optimización de la PCR para las especies objetivo y una optimización que garantiza el marcado de bandas reproducibles (Chaudhari *et al.*, 2018). Una de las desventajas de esta técnica es que los polimorfismos solo se detectan como la

presencia o ausencia de una banda de cierto peso molecular (Al-Samarai y Al-Kazaz, 2015). Al-Samarai y Al-Kazaz (2015) explican que en la última década esta tecnología ha sido una de las más usadas para desarrollar marcadores de ADN, debido a que proporciona una vista rápida y eficiente de los polimorfismos.

## **2.2. Fundamentación referencial.**

### **2.2.1. Diversidad genética.**

La diversidad biológica, conocida también como biodiversidad, está definida como la variabilidad, variedad de seres vivos y de los nichos ecológicos en que estos viven. Lastimosamente medir dicha biodiversidad resulta muy difícil, puesto que se enfrenta a muchos problemas debido a su carácter multidimensional, que no se puede reducir a un solo número (Molina-Freaner *et al.*, 2010).

Molina-Freaner *et al.* (2010) expresan que la biodiversidad incluye tres niveles, los cuales son: la diversidad de especies, la diversidad de ecosistemas, y por último la variabilidad genética de las poblaciones.

Aunque existen muchas limitaciones respecto a la integración entre los diferentes niveles, hay que señalar que la diversidad genética es uno de los niveles más básicos de organización, pues lo constituyen los genes. Es de hecho en este nivel donde se da la variación que permite evolucionar a las poblaciones, para así adaptarse a sus ambientes, aquellos que llevan a la adaptación y la especiación (Piñero, 2008).

### **2.2.2. Diversidad genética en teca.**

Nieto-Rodríguez *et al.* (2013) indican que la diversidad genética de la teca dentro del Ecuador ha tenido un estudio bastante limitado y no ha tenido resultados relevantes en temas como el mejoramiento genético de la especie, sobre todo a nivel de silvicultores pequeños y medianos, quienes tienen en su gran mayoría fuentes de origen poco fiables de esta especie, como viveros cuyas fuentes semilleras son pobres genéticamente y provenientes de árboles deficientes.

En Latinoamérica, Molina-Quesada *et al.* (2018) explican que pocos países han demostrado interés por el mejoramiento genético de la teca. Uno de estos países interesados es Costa Rica, nación que incluso exporta semillas a otros países de la región en vista de que poseen fuentes semilleras certificadas y cuyos resultados son excelentes en campo (Murillo *et al.*, 2013). Sin embargo, otros países como Ecuador no han logrado establecer fuentes semilleras a la altura de países como Costa Rica, y la legislación no ha logrado controlar la propagación precipitada de árboles que luego pueden representar peligros genéticos en las poblaciones de teca.

### **2.2.3. Diversidad de los recursos genéticos forestales.**

También llamados recursos genéticos arbóreos, estos no son más que el material genético de arbustos y especies forestales con valor actual o futuro. Esto significa que pueden representar cualidades que en posteriores generaciones significarán algún tipo de utilidad debido a la necesidad como por ejemplo, la utilización de dichos recursos (Grijalva *et al.*, 2016).

Para comprender a que hace referencia la diversidad de estos recursos, es importante aclarar que esta se basa en dos ejes principalmente, los patrones de distribución, que no es más que cómo se distribuyen los individuos forestales dentro de las poblaciones; y la diversidad genética dentro de cada especie, la cual hace referencia al número de características genéticas de las especies que se da entre otras cosas por los patrones de distribución adoptados que suelen llevar a diferentes adaptaciones evolutivas en función de las necesidades de las poblaciones (Molina-Freaner *et al.*, 2010).

Casas *et al.* (2017), indican que la importancia de conocer la diversidad genética se basa en que permite, entre otras cosas, la identificación de poblaciones y especies que presentan mayores riesgos de desaparecer, o al menos de disminuir su diversidad, además de priorizar ciertas poblaciones con la finalidad de permitir su conservación en sus lugares de origen. Grijalva *et al.* (2016) reconocen que, existen otras cualidades importantes de destacar, como el hecho de que la diversidad de estos recursos es esencial para el mantenimiento adecuado de la biodiversidad, de una correcta absorción de compuestos atmosféricos como el CO<sub>2</sub> e incluso para el disfrute de las sociedades de dichos recursos, desde actividades simples como la recreación turística.

#### **2.2.4. Escases de los recursos genéticos forestales.**

Grijalva *et al.* (2016) aseguran que, al hablar de escases en este tipo de recursos, es común incurrir en errores como pensar que son únicamente el bajo número de especies forestales en un área determinada. Sin embargo, dicha escases también incluye otros factores como el bajo número de características genéticas entre poblaciones de una misma especie, e incluso entre individuos dentro de una misma población. Ejemplos claros de estas últimas son la nula capacidad de ciertas poblaciones o individuos a reaccionar y defenderse ante determinadas enfermedades, sobre todo a pesar de que existan otros individuos de la misma especie o población que si poseen la capacidad antes mencionada.

Las razones por las que dicha escases se suscita son variadas. Grijalva *et al.* (2016) mencionan que muchas tienen que ver con acciones antropogénicas, sobre todo en especies comerciales usadas ya sea para la producción maderera e incluso para la alimentación, además de la producción de productos forestales no maderables como el caucho; entre dichas razones Llanos *et al.* (2019) aseguran que están el uso descuidado de individuos con “características superiores” como fustes rectos, alturas mayores a la habituales y pocas ramificaciones (según sea el caso), que a pesar de sus excelentes atributos, en ocasiones no cuentan con genes que les permitan resistir los daños provocados por ciertas enfermedades y plagas. Es entonces cuando la propagación de los primeros individuos y el olvido de los segundos provocan que genes primordiales para las especies se pierdan, corriendo el riesgo de que incluso se pierda la propia especie.

#### **2.2.5. Poblaciones de escasa diversidad genética para producción forestal.**

En muchos países, sobre todo en vías de desarrollo como Ecuador, es común establecer plantaciones forestales usando como fuentes de propagación individuos o poblaciones sobre las cuales no se ha tenido ningún cuidado o evaluación en términos como la superioridad o idoneidad de dichas fuentes, el manejo silvicultural que estas recibieron e incluso las características genéticas que estas poseen (Meza *et al.*, 2017).

Meza *et al.* (2017) indican que desafortunadamente, el uso de esas fuentes ya mencionadas para propagar individuos estableciendo plantaciones usando medios sexuales como las

semillas o medios asexuales como estacas, rizomas y otros; puede incurrir en la formación de individuos con características comercialmente deficientes, con baja o nula capacidad de resistir ciertas enfermedades e incluso con poca capacidad de adaptación a inclemencias del clima que otros individuos si tolerasen.

Según Meza *et al.* (2017) el uso de fuentes genéticas descritas anteriormente tiene varias desventajas, entre las que se pueden citar porcentajes grandes de incidencia de enfermedades, las cuales pueden ser muy variadas, la necesidad de podas y raleos más intensos y en periodos más cortos, la aplicación de plaguicidas y fertilizantes que en condiciones óptimas no serían necesarios, y en general, cuidados más intensos de los que requerirían plantaciones cuyos orígenes sean mejores a los mencionados. Cabe recalcar que todo lo mencionado se traduce claramente a pérdidas económicas que son fácilmente evitables usando fuentes seguras de propagación.

Casas *et al.* (2017) expresan que justamente el uso de individuos descritos en este punto ha provocado pérdidas significativas en muchos países, incluido Ecuador, en donde no se ha realizado un mejoramiento genético integral en muchas especies forestales, poniendo en riesgo poblaciones con características únicas y valiosas, tanto a nivel ecológico como económico. Ha sido así como el uso de especies como el *Schizolobium parahybum* (pachaco) ha disminuido drásticamente, debido al ataque de patógenos que han mermado poblaciones enteras de esta especie con enfermedades como la muerte regresiva y la pudrición del fuste, obligando a los productores forestales a disminuir su uso y a buscar otras especies con similares características que reemplacen al pachaco en el mercado maderero (Belezaca *et al.*, 2011).

**CAPÍTULO III**

**METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN**



### **3.1. Materiales y métodos.**

#### **3.1.1. Localización de la investigación.**

##### **3.1.1.1. Fase de campo.**

La fase de campo, concerniente a la recolección de muestras de diferentes individuos de teca pertenecientes a diferentes parcelas, se realizó en la finca experimental “La Represa”, propiedad de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo (UTEQ) y ubicada en el recinto Fanta de la parroquia San Carlos, perteneciente al cantón Quevedo.

##### **3.1.1.2. Fase de laboratorio.**

La fase de laboratorio consistió en el análisis de las muestras recolectadas mediante técnicas biotecnológicas y de biología molecular, entre estas están la extracción del ADN de cada muestra y su posterior análisis. Este análisis se realizó en el laboratorio de biotecnología perteneciente a la UTEQ.

### **3.2. Tipo de investigación.**

El tipo de investigación usado fue experimental-analítica, puesto que se realizaron diversos procesos que consistieron en la extracción de ADN, determinación de la concentración y pureza del ADN extraído, la amplificación de las muestras extraídas, entre otras actividades que finalizaron en el análisis de la información obtenida con el propósito de determinar en función de esta, la familiaridad de las muestras de los individuos recolectados.

### **3.3. Métodos de investigación.**

Se empleó el método comparativo, debido a que se verificó cual es el mejor protocolo de extracción de ADN a partir de hojas de la especie forestal en estudio, con la finalidad de saber cuál es el protocolo idóneo para usarse en la extracción de las muestras que se emplearon para el análisis genético.

El método hipotético-deductivo fue fundamental en la investigación, sobre todo debido a que, partimos de la premisa que reza que existe alta diversidad genética entre las procedencias a evaluar, dicha diversidad ha sido verificada al evaluar genéticamente las procedencias, deduciendo finalmente mediante los resultados en los geles RAPD la diversidad de estas.

### **3.4. Fuentes de recopilación de información.**

#### **3.4.1. Fuentes primarias**

Mediante la observación directa y el análisis de las características fenotípicas, se seleccionaron hojas maduras y sanas que se usaron en la extracción de ADN, lo cual permitió evaluar el mejor protocolo. Las mismas características fenotípicas ayudaron a seleccionar los cinco mejores individuos de cada procedencia, los cuales se evaluaron genéticamente, tomando un total de 15 individuos.

#### **3.4.2. Fuentes secundarias.**

Fundamentalmente se usaron fuentes secundarias como artículos científicos, tesis, libros y otras fuentes, con el objetivo de seleccionar la mejor información y complementar la investigación.

### **3.5. Diseño de la investigación.**

#### **3.5.1. Recolección de las muestras.**

Se recolectaron las muestras directamente del número de individuos ya mencionados por cada procedencia, específicamente fueron hojas jóvenes y sanas, que luego de ser limpiadas y almacenadas, se llevaron a las instalaciones del laboratorio de biotecnología de la UTEQ para su procesamiento.

### 3.5.2. Validación de un protocolo de extracción de ADN.

#### 3.5.2.1. Análisis estadístico.

Para la evaluación del mejor protocolo de extracción de ADN se empleó un diseño completamente al azar con cuatro tratamientos (protocolos) con arreglo de un solo factor, los cuales tuvieron cuatro repeticiones, con ocho observaciones cada una. Para determinar diferencias entre medias se empleó la prueba de Tukey ( $P < 0.05$ ). El esquema del análisis de varianza se presenta en la Tabla 1, mientras que el modelo matemático se presenta seguido de esta.

**Tabla 1.** Esquema del análisis de varianza.

| Fuente de variación | Grados de libertad |
|---------------------|--------------------|
| Tratamiento         | (t-1)              |
| Repetición          | (r-1)              |
| Error               | (t-1) (r-1)        |
| Total               | (t*r)-1            |

Fuente: Carmona *et al.* (2002).

Modelo matemático:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

Siendo:

$Y_{ij}$ : Valor de la observación.

$\mu$ : El valor medio de todos los tratamientos.

$\tau_i$ : efecto del tratamiento i

$\varepsilon_{ij}$ : Error experimental.

### **3.5.3. Extracción y purificación de ADN.**

Se analizaron cuatro protocolos de extracción y purificación de ADN: Uyemoto *et al.* (1998), Doyle y Doyle (1998), Dellaporta *et al.* (1983) y el kit de extracción de ADN PureLink Genomic Plant DNA de Invitrogen (2012) usando hojas jóvenes de teca. Con las muestras recolectadas, a fin de validar cual es estos resulta factible para la extracción y purificación de ADN, se procedió a la lisis celular, la purificación del ADN de las proteínas y demás compuestos no útiles para la investigación, la precipitación y la conservación de las muestras.

#### **3.5.3.1. Protocolo Uyemoto *et al.* (1998).**

Este protocolo indica lo siguiente:

1. Macerar el tejido con nitrógeno líquido y agregar buffer (solución) de extracción previamente calentado a 65 °C, homogenizar usando el vortex e incubar por 20 minutos a 60 °C.
2. Centrifugar por 3 minutos a 13000 rpm y recuperar el sobrenadante para añadirle 600 µl de cloroformo isoamílico, mezclar por inversión y centrifugar nuevamente por 5 minutos a 12000 rpm.
3. Recuperar el sobrenadante y añadir un volumen igual de isopropanol frio, incubar por 10 minutos y centrifugar a máxima velocidad por 8 minutos.
4. Desechar la fase acuosa y lavarla con etanol al 80%, centrifugar por 2 minutos a 12000 rpm, deshacerse del etanol, dejar secar y resuspender en 25 µl de buffer TE.
5. Por último, añadirle 10 µl de ARNasa e incubar a 37 °C durante una hora.

#### **3.5.3.2. Protocolo Doyle y Doyle (1987).**

De acuerdo con esta técnica, se deben seguir las siguientes instrucciones:

1. Macerar el tejido vegetal de hojas en nitrógeno líquido y agregar 800 µl de Buffer precalentado a 60 °C y añadir 5 µl de ácido ascórbico, para después vortexear.
2. Centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos y transferir el sobrenadante a otro tubo al que se le debe añadir 4 µl de ARNasa, para incubar a 65 °C por cinco minutos.
3. Agregar a la muestra 60 µl de cloroformo isoamílico, mezclar por inversión y centrifugar por 10 minutos a 13000 rpm.

4. Recuperar el sobrenadante y precipitar con un volumen igual de isopropanol para incubar en hielo por 10 minutos.
5. Centrifugar a 13000 rpm por 5 minutos y eliminar la fase líquida, lavar con etanol al 70% el isopropanol residual y centrifugar a 13000 rpm por 2 minutos, retirar el etanol y dejar secar por 10 minutos para resuspender en 15 µl de buffer TE 1X.

### **3.5.3.3. Protocolo Dellaporta *et al.* (1983).**

Este protocolo indica lo siguiente:

1. Macerar el tejido vegetal de hojas en un mortero hasta obtener un polvo fino y depositar en un tubo eppendorf cerca de 70 mg.
2. Añadir 800 µl de buffer de extracción, agitar e incubar en baño maría a 65 °C durante 10 minutos.
3. Retirar del baño maría y añadir 10 µl de acetato de potasio para después centrifugar a 1700 rpm por 30 minutos y dejar reposar por un periodo de 12 horas a 20 °C.
4. Realizar una segunda centrifugación no sin antes añadir isopropanol para formar la pastilla de ADN.
5. Retirar el sobrenadante y dejar secar con los tubos invertidos durante 10 minutos y después diluir en una solución TE.
6. Añadir fenol cloroformo, centrifugar y extraer el sobrenadante nuevamente para añadirle 400 µl de isopropanol y 60 µl de acetato de sodio y centrifugar una vez más.
7. Extraer el sobrenadante y dejar secar la pastilla con el tubo invertido para luego lavar con etanol al 70% y resuspender en TE al 1X.

#### **3.5.3.4. Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012).**

Pasos a seguir para la extracción:

1. Macerar la muestra vegetal con nitrógeno líquido en un mortero hasta obtener un polvo fino y mantener fría la muestra en todo momento hasta aplicar el primer buffer.
2. Agregar 180 µl de buffer de digestión y vortexear la muestra hasta homogenizar.
3. Agregar 20 µl de proteinasa K y vortexear para luego incubar en baño maría a 55 °C por 10 minutos.
4. Retirar la muestra del baño maría y agregarle 20 µl de ARNasa, incubar a temperatura ambiente durante 2 minutos y centrifugar durante cinco minutos a máxima potencia.
5. Recoger el sobrenadante en otro tubo y añadirle 200 µl de buffer de lisis, vortexear hasta homogenizar.
6. Añadir a la mezcla 200 µl de etanol concentrado en 96 – 100% y vortexear durante 5 segundos para conseguir una solución homogénea.
7. Depositar 640 µl de la solución en una columna con filtro para luego centrifugar 6000 a rpm por un minuto.
8. Desechar el tubo con el flujo, conservar la columna con el filtro y añadir un tubo nuevo, agregar 500 µl de buffer de lavado #1 a la columna con el filtro para proceder a centrifugar por un minuto a 6000 rpm.
9. Desechar el tubo y el flujo y conservar la columna con filtro, reemplazar de nuevo el tubo y agregarle al filtro el buffer de lavado #2, volver a centrifugar por 3 minutos a velocidad máxima.
10. Desechar el tubo con el flujo y colocar el filtro en un tubo eppendorf donde va a estar la solución con el ADN.
11. Añadir al filtro de 25 a 200 µl de buffer de elusión (en función de la cantidad requerida), incubar a temperatura ambiente por un minuto y centrifugar a velocidad máxima por 3 minutos

### 3.5.4. Evaluación de la calidad de ADN obtenido por protocolo.

Para conocer cuan eficiente fue la extracción de las muestras de ADN, estas fueron estudiadas en gel de agarosa al 1%, evaluando principalmente calidad de este, en función de sus valores de pureza. Dicha calidad fue medida en una escala porcentual que fue del 0% como degradado al 100% como excelente, tal como lo indica el cuadro a continuación (Nieto-Rodriguez *et al.*, 2013).

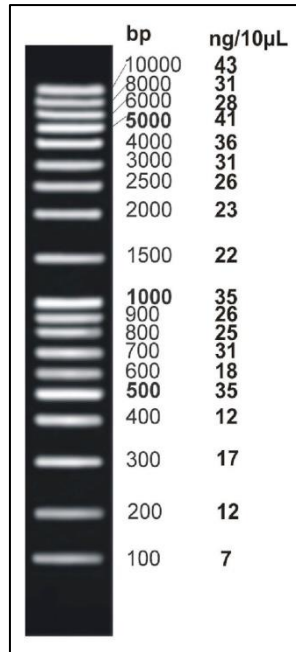
**Tabla 2.** Escala porcentual para medir la calidad de ADN.

| Porcentaje | Descripción      |
|------------|------------------|
| 100%       | Excelente        |
| 75%        | Alto             |
| 50%        | Medio            |
| 25%        | Bajo             |
| 0%         | Degradado o nulo |

Fuente: Nieto-Rodriguez *et al.* (2013).

### 3.5.5. Evaluación de la cantidad de ADN obtenido por protocolo.

La cuantificación de ADN se estimó mediante el uso de gel de agarosa al 1% y el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Invitrogen, 2012). Para ello cada muestra a evaluar se compuso de 3 µl de ADN extraído, 2 µl de agua ultrapura y 1 µl de buffer de carga 10X blue juice, sumando un total de 6 µl. Para el marcador de peso molecular se procedió a hacer exactamente lo mismo de modo que en todas las muestras y en el marcador se manejase el mismo volumen. Se migraron las muestras a 90 voltios durante 30 minutos en buffer TAE 1X y posterior a esto se evaluó la cantidad de ADN en función de la intensidad de la banda y las indicaciones del fabricante del marcador como indica la figura 1.



**Figura 1.** Escala de concentraciones y pares de base de 1Kb DNA Ladder para la estimación de la concentración de ADN.

**Fuente:** Invitrogen (2012).

### 3.5.6. Análisis de las muestras a través de RAPD.

Se realizó un análisis con marcadores moleculares del tipo RAPD (Amplificación aleatoria de ADN polimórfico), mediante la técnica descrita por Williams *et al.* (1990), con el propósito de determinar polimorfismos presentes entre las muestras a estudiar. Dicho proceso consistió básicamente de una reacción en cadena de la polimerasa mediante el uso de oligonucleótidos decaméricos, culminando con la visualización de las muestras en gel de agarosa al 1.5% mediante electroforesis.

#### 3.5.6.1. Selección de oligonucleótidos.

Una parte de los iniciadores utilizados para esta investigación fueron aquellos ya usados en otras investigaciones con otras especies forestales y agrícolas, demostrando excelentes resultados y polimorfismos variables, la otra parte correspondió a iniciadores escogidos al azar y ya probados en otras evaluaciones de la misma índole.



La Tabla 3, a continuación, muestra los cebadores seleccionados y sus respectivas secuencias.

**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para el análisis de las tres procedencias en esta investigación.

| <b>Código</b> | <b>Secuencia</b> |
|---------------|------------------|
| A 01          | 5'-CAGGCCCTTC-3' |
| OPA 04        | 5'-AATCGGGCTG-3' |
| OPA 10        | 5'-GTGATCGCAG-3' |
| OPA 15        | 5'-GACGGATCAG-3' |
| OPC 15        | 5'-GACGGATCAG-3' |
| PLAT          | 5'-GACAGACAGA-3' |
| M 04          | 5'-GGCGGTTGTC-3' |
| M 07          | 5'-CCGTGACTCA-3' |

### 3.5.6.2. Componentes de la PCR.

La Tabla 4 muestra los reactivos empleados en la PCR, siendo estos, 9.8 µl de agua ultra pura, 4 µl de buffer de PCR, 1 µl de cloruro de magnesio, 1 µl de dNTPs, 2 µl de primers, 0.2 µl de taq polimerasa y 2 µl de ADN, formando un volumen total de 20 µl (Williams *et al.*, 1990).

**Tabla 4.** Reactivos usados para la obtención de la PCR.

| No           | Reactivos           | Concentración | Cant. (µl) |
|--------------|---------------------|---------------|------------|
| 1            | Agua ultrapura      |               | 9.8        |
| 2            | Buffer PCR          | 10 x          | 4          |
| 3            | Cloruro de magnesio | 25 mM         | 1          |
| 4            | dNTPs               | 10mM          | 1          |
| 5            | Primers             | 1pmol/µl      | 2          |
| 6            | Taq polimerasa      | 5U/µl         | 0.2        |
| 7            | ADN                 |               | 2          |
| <b>TOTAL</b> |                     |               | <b>20</b>  |

Fuente: Williams *et al.* (1990).

### 3.5.6.3. Programa de PCR

La amplificación se llevó a cabo en un termociclador y sus condiciones son descritas en la tabla 5, cabe recalcar que estas fueron las establecidas por William *et al.* (1990).

**Tabla 5.** Programa de PCR.

| Etapa                | Tiempo (minutos) | Temperatura (°C) | Ciclos |
|----------------------|------------------|------------------|--------|
| Predesnaturalización | 1                | 94               | 1      |
| Desnaturalización    | 1                | 94               | 40     |
| Hibridación          | 1.30             | 36               | 40     |
| Polimerización       | 2                | 72               | 40     |
| Polimerización final | 10               | 72               | 1      |

Fuente: Williams *et al.* (1990).

Los fragmentos obtenidos fueron separados mediante electroforesis a 65 voltios durante 2 horas y 50 minutos, usando un gel de agarosa al 1.5%. La visualización de dichos resultados se realizó usando un fotodocumentador con luz UV.

### 3.5.7. Análisis estadístico.

La amplificación de iniciadores decaméricos en el número total de muestras, así como la selección de los oligonucleótidos con mayor número de bandas amplificadas, junto con la lectura de los geles RAPD, se efectuaron de manera directa, mediante la asignación del número 1 a la banda con mayor peso molecular, y así sucesivamente de manera descendente hasta la banda de menor peso molecular. Se calcularon las bandas amplificadas para cada nucleótido, donde 1 significa la presencia de una banda, y 0 ausencia de esta, asumiendo además que las bandas con igual velocidad de migración en el gel en individuos diferentes son idénticas.

Con los datos binarios se elaboraron matrices usadas para calcular las distancias genéticas entre y dentro de las procedencias, con base en el coeficiente de apareamiento simple. Los valores de diversidad de cada iniciador se calcularon por ecotipo, con la base de distancia de Nei (1978):

$$h_k = \frac{n}{n-1} \left( 1 - \sum_{i \neq j}^n p^2 \right)$$

Donde:

$p$  = Frecuencia de la banda en las poblaciones.

$n$  = Número de individuos analizados.

Se calculó el valor de la diversidad genética detectado en cada oligonucleótido con base en la estimación de  $r$ . Mientras el valor de diversidad de todas las muestras ( $H_T$ ), fue calculado basándose en el número total de marcadores e individuos analizados, usando la siguiente ecuación Nei (1978):

$$H_T = \sum_{k=1}^r \frac{h_k}{r}$$

Donde:

$H_T$  = Valor de diversidad total.

$h_k$  = Medias ponderadas por el valor de todos los marcadores.

$r$  = Numero de marcadores revelados para cada nucleótido.

### **3.5.8. Análisis de conglomerados**

Para el análisis de conglomerados, se evaluó la robustez del dendrograma RAPD, mediante el remuestreo y la generación de matrices de distancias genéticas hechas a partir de matrices de distancias reconstruidas y reducidas en el análisis estadístico. Dicho dendrogramas fue construido en función del método de agrupamiento de pares no ponderamos de medias aritméticas o UPGMA, mientras la estructura de las poblaciones fue inferida con base en el algoritmo de agrupamiento con un modelo bayesiano, el cual será corrido considerando K aglomerados genéticos caracterizados con las matrices de frecuencias de alelos, estimando así la proporción del genoma por individuo a partir de cada conglomerado genético, modelo propuesto por Pritchard, Wen y Falush (2010)

Todos los datos fueron analizados en el programa MEGA X (Kumar *et al.* 2018) y también en este programa fue elaborado el dendrograma.

## **3.6. Materiales.**

### **3.6.1. Materiales de campo.**

- Hojas de teca
- Machete.
- Fundas plásticas.
- Hielera.
- Libreta de apuntes.

### **3.6.2. Materiales de laboratorio.**

- Mandil.
- Puntas amarillas, azules y blancas.
- Guantes de nitrilo.
- Toallas desechables.
- Mascarillas.
- Gradillas.

- Tubos eppendorf de 1.5 ml.
- Matraces.

### **3.6.3. Equipo de laboratorio.**

- Microcentrífuga.
- Baño maría.
- Vortex.
- Micropipetas.
- Cabina de flujo.
- Cámara de electroforesis.
- Foto documentador.
- Trans iluminador.
- Termociclador

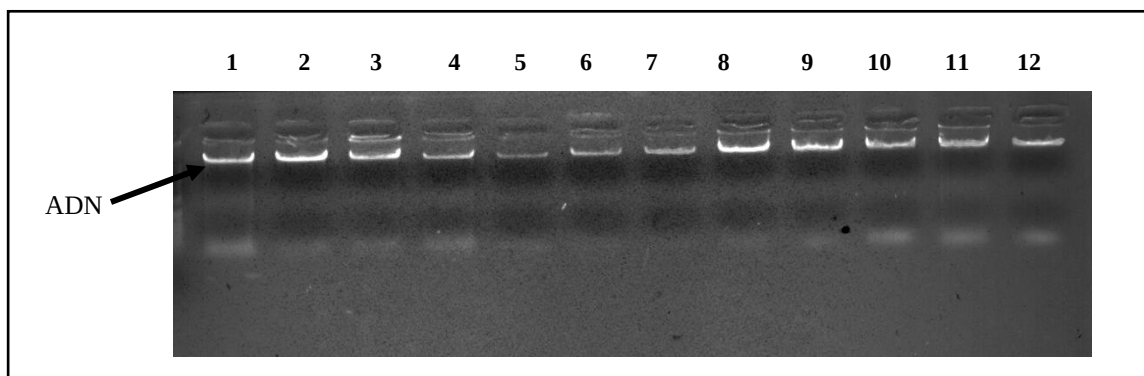
## **CAPÍTULO IV**

### **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

## 4.1. Resultados

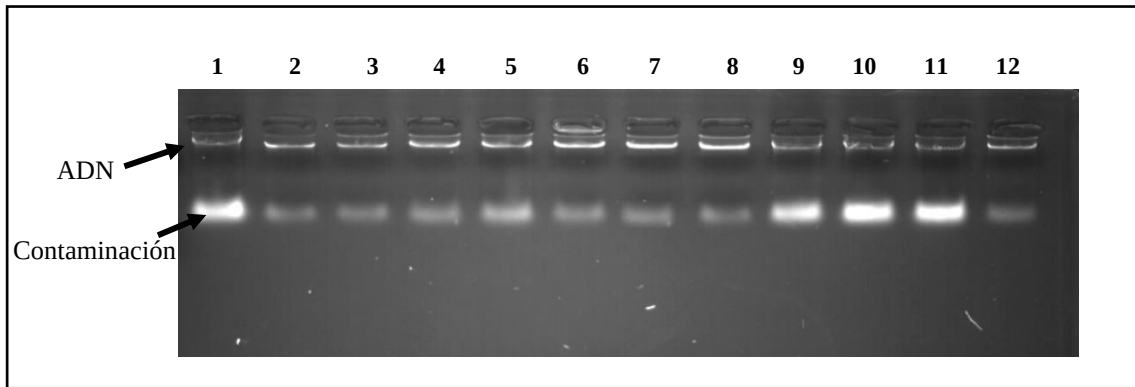
### 4.1.1. Validación de los protocolos de extracción de ADN.

Las Figuras 2, 3, 4 y 5 muestran los resultados de la visualización correspondientes a las muestras número 1 – 12 de cada protocolo, en estas se puede apreciar que la calidad de los protocolos Del kit Purelink Genomic DNA (Invitrogen, 2012) y Uyemoto *et al.* (1998) son significativamente mayores, sobre todo por la ausencia de contaminación y la presencia de las bandas de ADN bien definidas, aunque la concentración es baja en el protocolo del kit, mientras que el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) posee las muestras de menor calidad, lo que podemos observar en las bandas, en cambio, el protocolo Doyle y Doyle (1987) la presencia de contaminación es muy notoria, esto debido a que no se logró una purificación optima de las muestras.

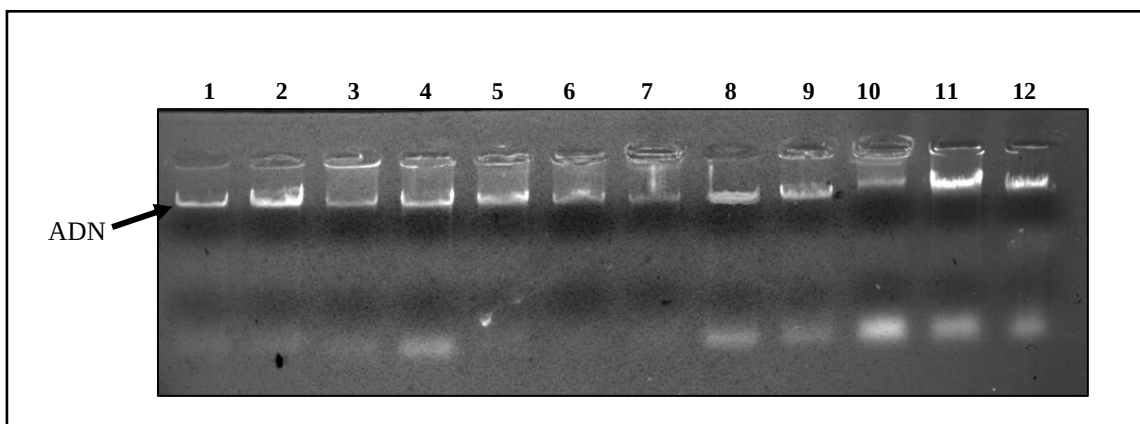


**Figura 2.** Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Uyemoto *et al.* (1998).

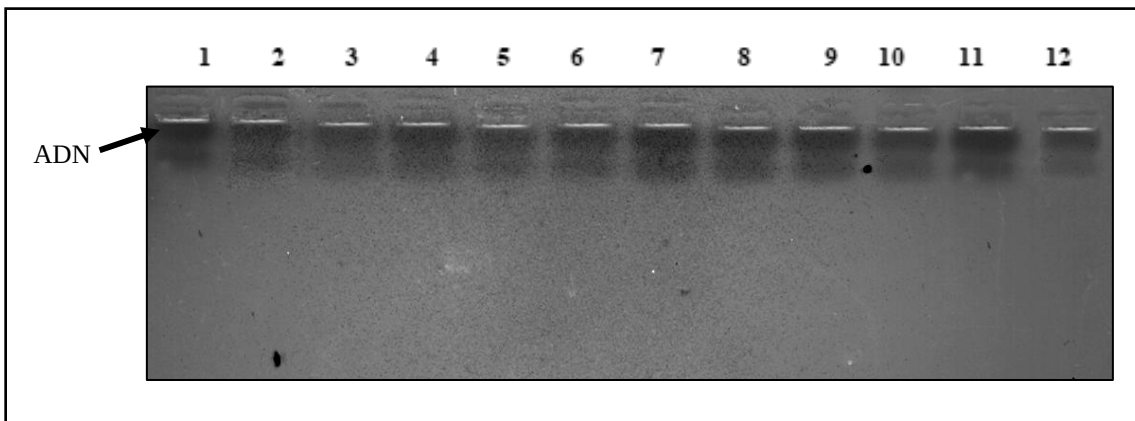




**Figura 3.** Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Doyle & Doyle (1987).



**Figura 4.** Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del protocolo Dellaporta *et al.* (1983).

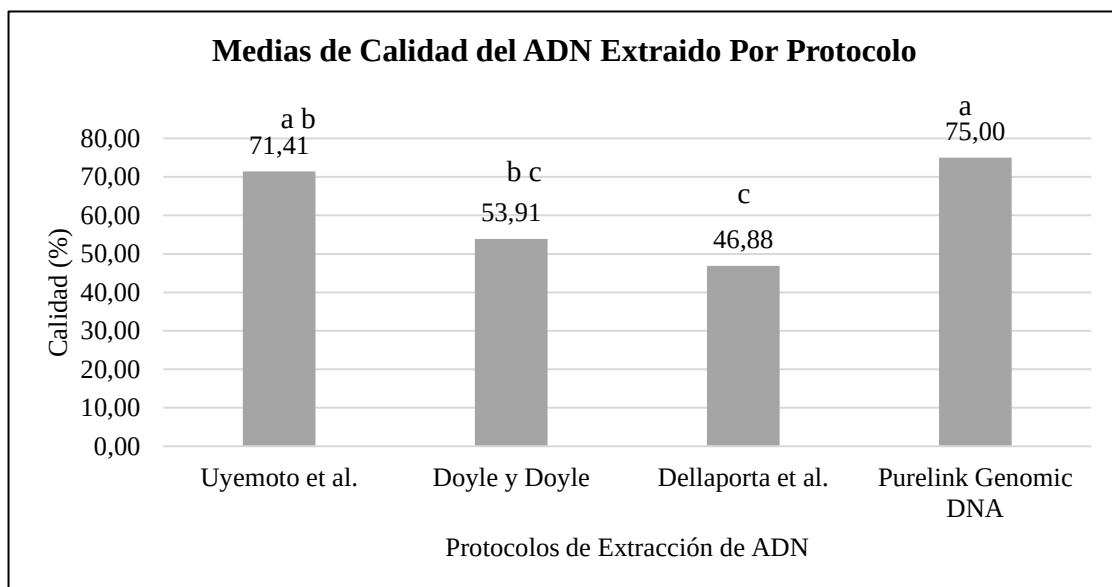


**Figura 5.** Producto de electroforesis en gel de agarosa al 1% de las muestras obtenidas a partir del Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012).

#### 4.1.2. Evaluación de la calidad de ADN extraído por cada protocolo.

Los resultados de las medias obtenidas para la calidad de ADN mostraron que el protocolo Purelink Genomic DNA Mini kit fue el mejor, donde la calidad de ADN es alta, con una media de 75%, a este le sigue el protocolo Uyemoto *et al.* (1998) con 71,41% (calidad media alta), los resultados inferiores consistieron en tercer lugar el protocolo Doyle y Doyle (1987) que llego a un promedio de 53,91% (calidad media) y el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) que obtuvo un porcentaje del 46,88% (calidad baja), siendo este ultimo protocolo el que obtuvo la calidad de ADN mas baja.

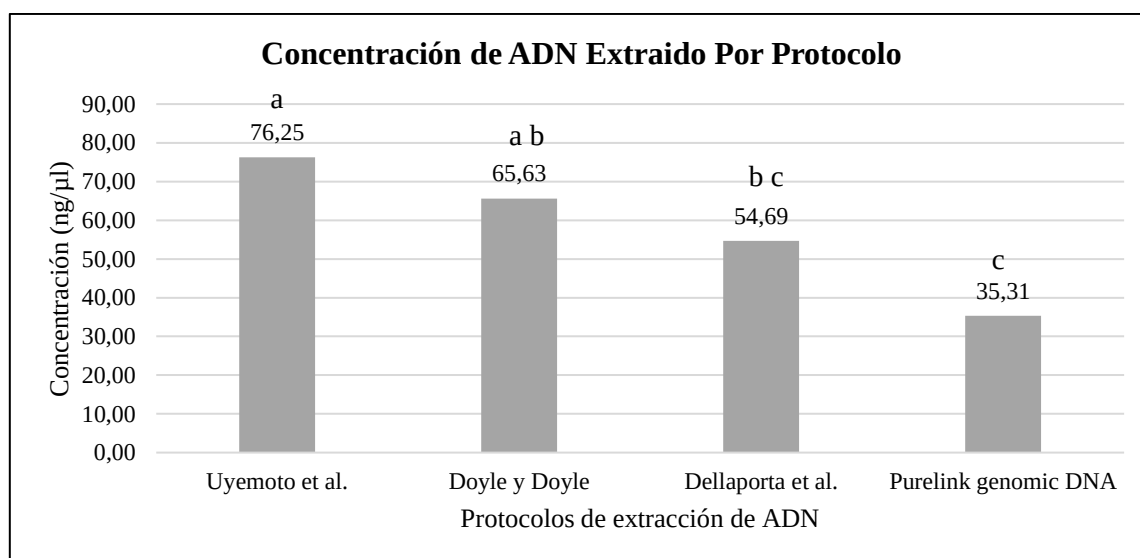
Los resultados antes mencionados se muestran en el Figura 5, mientras que los valores de cada una de las muestras se presentan en el Anexo 2.



**Figura 6.** Promedio de la calidad de ADN obtenido por cada protocolo, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

### 4.1.3. Evaluación de la concentración de ADN extraído para cada protocolo.

Los resultados de la concentración de ADN realizado mediante el uso de gel de agarosa y marcador de peso molecular determinaron que, el protocolo Uyemoto *et al.* (1998) con un promedio de concentración de 75,25 ng/μl, es el protocolo con la concentración más alta, a este le siguió el protocolo Doyle y Doyle (1987) con una concentración promedio de 65.63 ng/μl, tomando así el segundo lugar en concentración, el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) obtuvo el tercer lugar con 54,69 ng/μl, la concentración más baja la tuvo el kit Purelink Genomic DNA Mini Kit, con apenas 35,31 ng/μl. Los resultados de las concentraciones de cada una de las muestras se encuentran en el Anexo 3, mientras las medias y sus significancias se muestran también en la Figura 6, a continuación:



**Figura 7.** Promedio de concentración de ADN obtenido por cada protocolo, las medias con letras iguales no son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).

#### 4.1.4. Análisis genético usando amplificación aleatoria de ADN polimórfico.

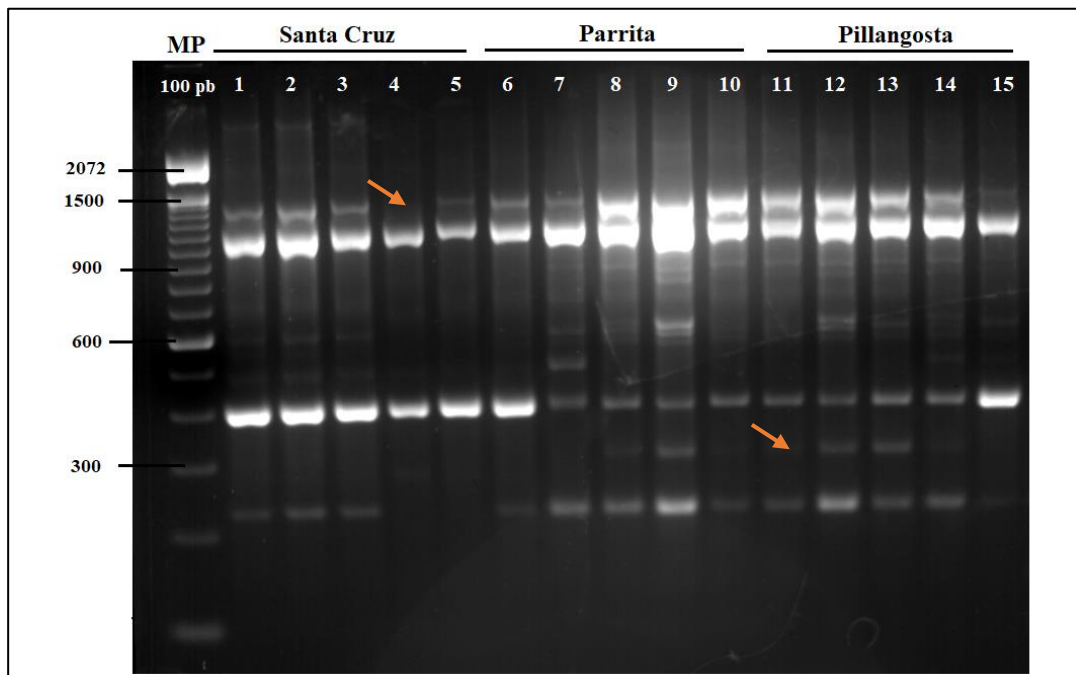
##### 4.1.4.1. Determinación de polimorfismo.

Las combinaciones de oligonucleótidos establecidas para la investigación y el polimorfismo alcanzado por cada una de estas se muestran en la Tabla 6, se presenta además el polimorfismo general y el número de bandas para cada una de las combinaciones. La combinación de mayor polimorfismo corresponde a OPA 04 y PLAT, con 11 bandas polimórficas de 15, alcanzando un polimorfismo del 73,33%, mientras el menor polimorfismo lo obtuvo la combinación M 07 y OPA 10, con 6 bandas polimórficas de 15, llegando a un polimorfismo del 40%.

**Tabla 6.** Combinaciones de oligonucleótidos junto con el número de bandas amplificadas, sus polimorfismos y resultados promedio de estos últimos.

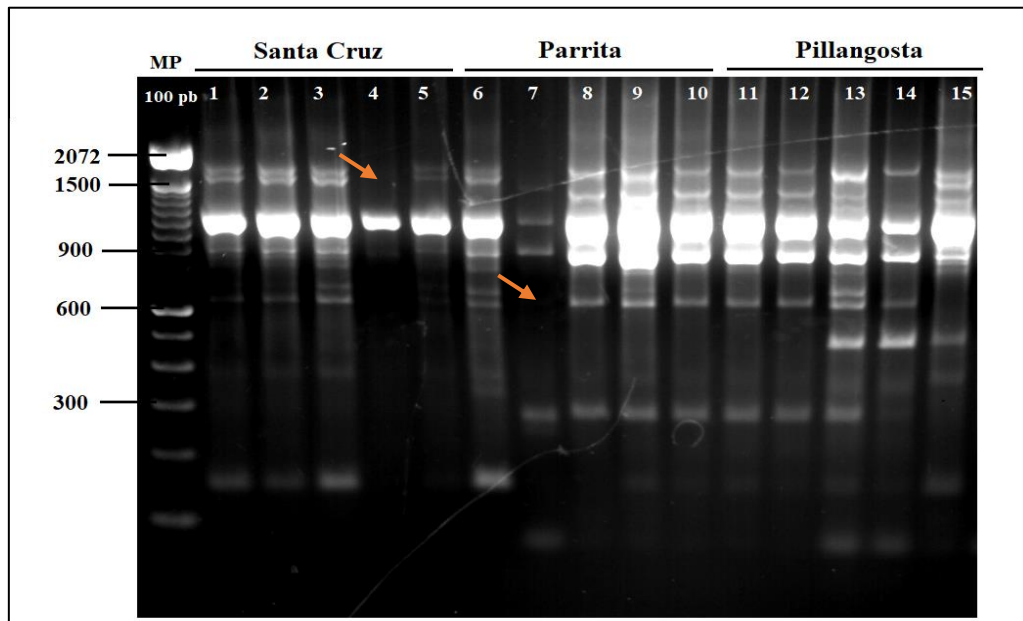
| Combinación de oligonucleótidos | Secuencias       | Bandas amplificadas | Bandas polimórficas | Polimorfismo (%) |
|---------------------------------|------------------|---------------------|---------------------|------------------|
| M 07                            | 5'-CCGTGACTCA-3' | 15                  | 9                   | 60,00            |
| A 01                            | 5'-CAGGCCCTTC-3' |                     |                     |                  |
| OPA 04                          | 5'-AATCGGGCTG-3' | 15                  | 11                  | 73,33            |
| PLAT                            | 5'-GACAGACAGA-3' |                     |                     |                  |
| M 07                            | 5'-CCGTGACTCA-3' | 15                  | 6                   | 40,00            |
| OPA 10                          | 5'-GTGATCGCAG-3' |                     |                     |                  |
| OPC 15                          | 5'-GACGGATCAG-3' | 15                  | 8                   | 53,33            |
| A 01                            | 5'-CAGGCCCTTC-3' |                     |                     |                  |
| OPA 15                          | 5'-GACGGATCAG-3' | 15                  | 9                   | 60,00            |
| M 04                            | 5'-GGCGGTTGTC-3' |                     |                     |                  |
| TOTAL                           |                  | 75                  | 33                  |                  |
| PROMEDIO                        |                  | 15                  | 8,6                 | 57,33            |

La Figura 8 muestra el resultado de la amplificación de ADN usando la combinación de oligonucleótidos M07 y A01, indicando un patrón típico en la especie utilizada, con evidentes monomorfismos y polimorfismos, se muestra además el marcador de peso molecular (MP) de 100 pares de bases (pb) DNA Ladder Invitrogen. Hay que recordar que las muestras están divididas en tres grupos, siendo estos, Santa Cruz, Parrita y Pillangosta, los cuales son sus subzonas de origen en Costa Rica, las flechas de colores indican los polimorfismos presentes.



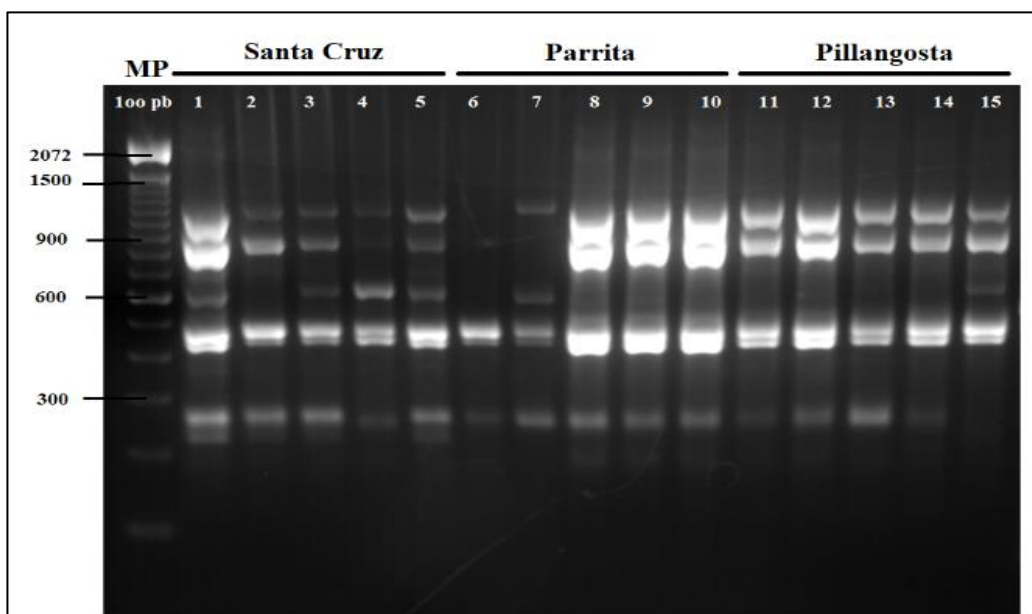
**Figura 8.** Productos de PCR obtenidos de la combinación M07 y A01, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda.

La Figura 9 muestra los resultados obtenido a partir de la amplificación de ADN mediante la combinación de primers OPA 04 y PLAT, junto con el marcador de peso molecular, se muestra bandas de mayor intensidad en el sector con las bandas de peso más alto.



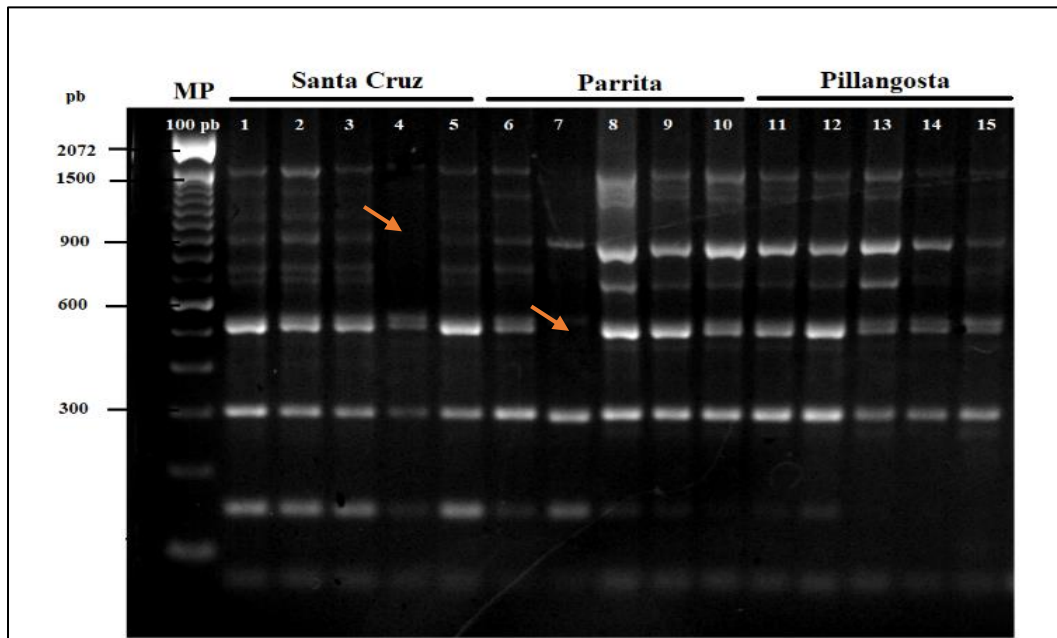
**Figura 9.** Productos de PCR obtenidos de la combinación OPA 04 y PLAT, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda.

La Figura 10 evidencia los resultados de la amplificación de ADN usando la combinación de primers correspondiente a M 07 y OPA 10, se muestra una cantidad de bandas regular con la típica intensidad en las bandas de mayor peso, en la imagen se aprecia además el marcador de peso molecular.



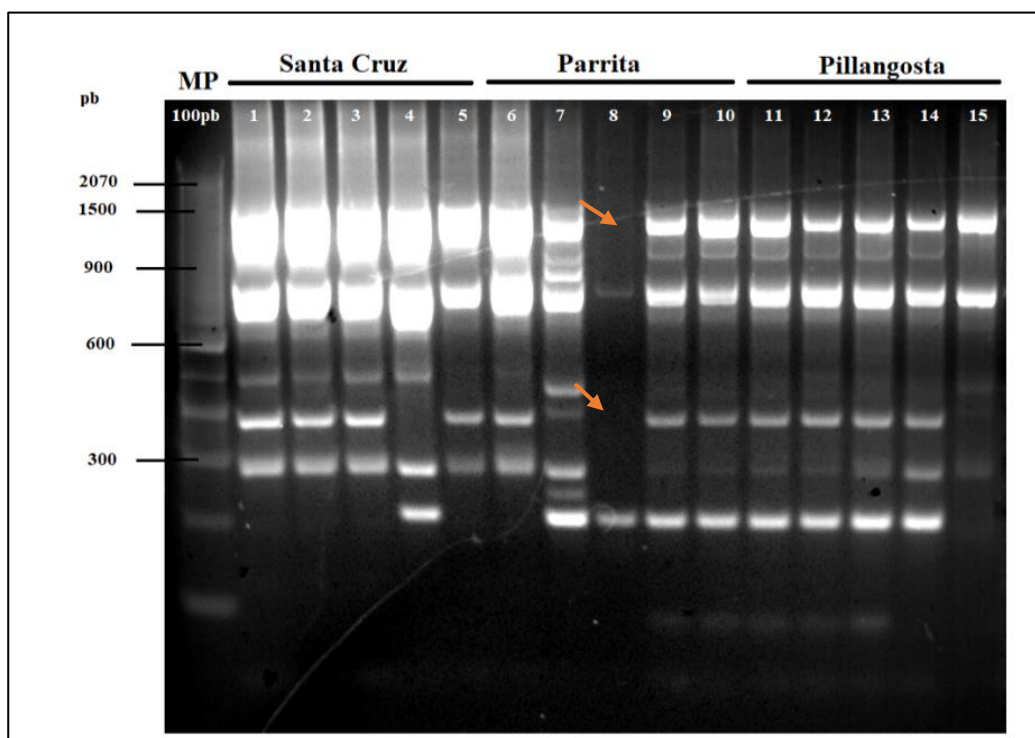
**Figura 10.** Productos de PCR obtenidos de la combinación M 07 y OPA 10, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda.

En la Figura 11 se observa el resultado de la amplificación de ADN usando la combinación de oligonucleótidos OPC 15 y A 01, junto con el marcador de peso molecular 100pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda, se muestra en la imagen un patrón de bandas típico para la especie usada en este análisis, los polimorfismos son además evidentes.



**Figura 11.** Productos de PCR obtenidos de la combinación OPC 15 y A 01, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda.

La Figura 12 muestra el resultado de la amplificación de las muestras de ADN usando la combinación de primers OPA 15 y M 04, mostrando el patrón de bandas habitual, junto con el marcador de peso molecular.



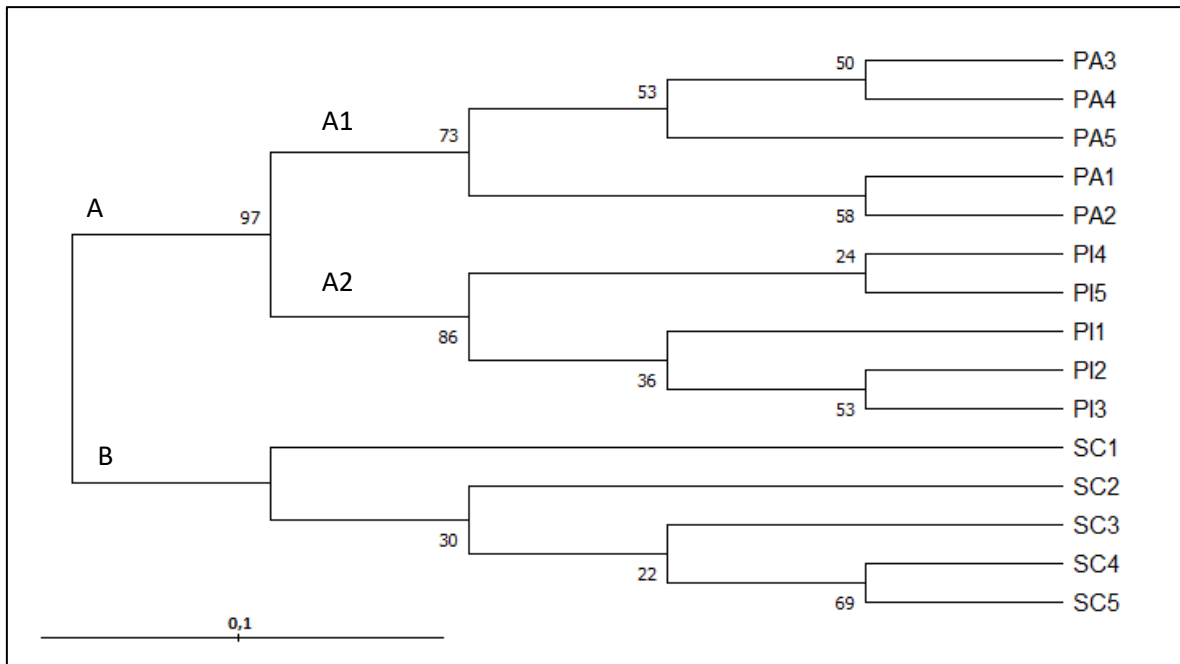
**Figura 12.** Productos de PCR obtenidos de la combinación OPA 15 y M 04, junto con el marcador de peso molecular (MP) 100 pb DNA Ladder Invitrogen a la izquierda.

#### 4.1.5. Agrupamiento para determinar la diversidad genética

El dendrograma construido en función del método de agrupamiento de pares no ponderamos de medias aritméticas o UPGMA, se dividió principalmente en tres grupos correspondientes a cada una de las procedencias en estudio, Siendo el grupo A correspondiente a Santa Cruz, grupo B correspondiente a Pillangosta y Parrita.

La Figura 13 muestra el dendrograma con los datos mencionados anteriormente, las respectivas distancias genéticas de cada rama, siendo estas del 97% entre los individuos de los grupos A y B, a su vez, las distancias dentro de los grupos fueron de: del 73% en el primer subgrupo A, del 86% en el segundo subgrupo A y del 30% dentro del grupo B. hay que recalcar además que el germoplasma de las poblaciones de Parrita (PA) y Pillangosta (PI) se encuentran más estrechamente relacionados. Estos datos nos indican la tendencia que tuvieron los individuos para agruparse en función de las procedencias en que fueron muestreadas.





**Figura 13.** Dendrograma generado a partir de datos RAPD, usando las tres procedencias en estudio, las distancias evolutivas se calcularon mediante el método UPGMA, el análisis de conglomerados se construyó usando el método de Nei (1978). Los individuos con la codificación SC corresponden a la procedencia Santa Cruz, Los de codificación PA, Parrita y los individuos con la codificación PI, Pillangosta.

## 4.2. Discusión

Con la utilización de los 4 protocolos propuestos en la presente investigación, se logró la extracción de ADN genómico en concentración y calidad diferenciada. La concentración (76,25 ng/μl) y la pureza (71,40%) altas en el protocolo Uyemoto *et al.* (1998) resaltan la efectividad de este en especies leñosas como *Tectona grandis*, mientras en el Protocolo Doyle y Doyle (1987) se obtuvo ADN medianamente bueno, el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) resulta no tan efectivo debido a la degradación de los ácidos nucleicos ocurrida durante el proceso, los datos de esta investigación concuerdan con los obtenidos por Nieto-Rodríguez *et al.* (2013), quien destaca que el protocolo Uyemoto es mejor frente a los protocolos Doyle y Doyle y Dellaporta, aunque en el estudio de Nieto-Rodríguez *et al.* (2013) no se evaluó la efectividad del protocolo Purelink, Los resultados de la extracción también coinciden con Fatima *et al.* (2019) en cuyo estudio extrajeron ADN de la misma especie usando un protocolo cuyo buffer de extracción posee concentraciones de CTAB, PVP, NaCl, EDTA, Tris-HCl y mercaptoethanol idénticas a las del protocolo Uyemoto.

Es habitual reconocer la superioridad de los kits de extracción de ADN frente a los protocolos habituales, debido sobre todo al uso de filtros de purificación que ayudan a obtener ADN de pureza excelente (75% en este estudio), pero de concentraciones medianas (35,31 ng/μl), esto es algo en lo que coinciden Hansen *et al.* (2015) en cuyo caso resaltan la eficacia de los kits de extracción frente a los protocolos habituales, sin embargo, también resaltan la dificultad de conseguir kits de extracción de ADN debido a sus elevados costos, a pesar de esto, es importante en estos casos elegir que es mejor, concentraciones bajas pero purezas altas, o concentraciones altas pero purezas bajas.

Teniendo en cuenta que para estudios que incluyan PCR es importante diluir el ADN original para lograr así reacciones eficientes, también es fundamental lograr purezas altas para alcanzar dichas reacciones. Si ponemos en comparación que es más importante, definitivamente la pureza está en primer lugar, puesto que esta incidirá directamente en el éxito o fracaso de la PCR, es por esa razón que, para la extracción de ADN de las procedencias evaluadas, se usó el kit de extracción antes mencionado.

Los geles de agarosa producto de la electroforesis con los resultados de las PCR usando las diferentes combinaciones de oligonucleótidos demostraron un patrón de bandas monomórficas, ocultando diferencias significativas a simple vista, dichos patrones

concuerdan con los obtenidos por Cruz *et al.* (2019) quien uso las mismas combinaciones en cultivares de *Musa spp.* Dichos oligonucleótidos han sido ya usados en combinaciones (Cruz *et al.*, 2019) y solos en otras especies como *Theobroma cacao* (Carranza *et al.*, 2008), incluso probados por separado en la especie en estudio por Nieto-Rodríguez *et al.* (2013), demostrando su efectividad para especies agrícolas y en este caso, forestales como *T. grandis*,

Cabe destacar que los niveles más altos de polimorfismo los obtuvo la combinación de partidores OPA 04 y PLAT, que resultó en 11 bandas polimórficas de 15 bandas, logrando un polimorfismo del 73.33%, esto mientras la combinación con el polimorfismo fue la de los partidores M 07 y OPA 10, logrando un polimorfismo del 40%, gracias a seis bandas polimórficas de 15 que se obtuvieron. El promedio de polimorfismo resultante de las cinco combinaciones de partidores fue de 57,33%.

El dendrograma elaborado a partir del método UPGMA, demostró que los individuos están relacionados fuertemente en función de su origen, de modo que solo lograron establecerse dos grupos principales, donde el grupo A corresponde al germoplasma de Parrita y Pillangosta, y el grupo B corresponde al de Santa Cruz, , cabe mencionar que el grupo más alejado genéticamente corresponde a la procedencia de Santa Cruz, dicho resultado concuerda con lo dicho por Nieto-Rodríguez *et al.* (2013), quien ya estudió las tres procedencias junto con otras diez poblaciones ubicadas en diferentes zonas del litoral ecuatoriano, en dicho estudio, además se dejó claro que las tres procedencias de Costa Rica están alejadas genéticamente de las poblaciones ecuatorianas.

Con los resultados obtenidos en la investigación se aprueba la hipótesis alterna, la cual dicta que existe poca diversidad genética entre las procedencias estudiadas

**CAPITULO V**

**CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES**

## 5.1. Conclusiones

- Se concluye que el protocolo Uyemoto *et al.* (1998) resulta excelente para la extracción de ADN de *T. grandis*, debido a los altos niveles de concentración y pureza alcanzados en la investigación, sin embargo, hay que resaltar que la superioridad en los niveles de pureza del Kit de extracción de ADN PureLink Genomic DNA (Invitrogen, 2012), lo hacen una importante opción al momento de contar con los recursos para la adquisición de estos, no solo por la reducción del tiempo de la extracción, sino también por evitar el uso de compuestos peligrosos como ácido clorhídrico, cloroformo y otras sustancias tóxicas que es preciso usar en la extracción de ADN a través de protocolos.
- Los niveles de diversidad genética fueron relativamente bajos, hecho que queda demostrado en los polimorfismos obtenidos, que tuvieron un promedio de 57,33%. Sin embargo, hay que recalcar que los individuos están relacionados en función de su procedencia de origen, formando tres grupos principales, pertenecientes a cada procedencia. otro punto a resaltar es la lejanía genética de la procedencia de Santa Cruz respecto a Parrita y Pillangosta, las cuales están relacionadas entre sí, según los resultados obtenidos en el dendrograma.
- Los RAPD's generaron información consistente para el análisis de los datos de las accesiones estudiadas, logrando obtener polimorfismos en todas las combinaciones de oligonucleotidos usadas. Estos datos generaron información altamente confiable para el futuro manejo del germoplasma estudiado con miras a la conservación y al mejoramiento genético.

## 5.2. Recomendaciones

- Debido a la dificultad que supone la extracción de ADN de ciertas especies forestales cuya composición posee altos contenidos de compuestos como polifenoles, taninos, polisacáridos y otros, es una necesidad el estudio de diferentes protocolos de extracción de ADN, sobre todo volviendo los procesos más específicos para cada especie, es importante recalcar que en lo posible y de ser precisos, es mejor agregar ciertas modificaciones a los protocolos que permitan obtener mejores resultados según sea la especie o el tejido del cual se pretende extraer ADN.
- Es recomendable el uso de diferentes partidores en las investigaciones de diversidad genética, pues esto permite aumentar el rango de exactitud de las investigaciones, El uso de una pareja de partidores en la técnica RAPD, permite además un mayor número de bandas al momento de revelar los resultados de la PCR, lo que se traduce también en resultados más exactos con menos reacciones de PCR de las habituales.
- Es importante el estudio de la diversidad genética de diferentes poblaciones y especies forestales, con el objetivo de entre otras cosas, lograr reconocer su estructura genética, hecho que puede llevar al mejoramiento genético de dichas especies, a su diversificación y a un manejo más responsable de los recursos forestales del país.

## **CAPÍTULO VI**

### **BIBLIOGRAFÍA**

## 6.1. Literatura Citada

- Al-Samarai, F., Al-Kazaz, A. (2015). Molecular Markers: an Introduction and Applications. *European Journal of Molecular Biotechnology*, 9(3), 118–130.
- Alia, R., Soto, A., Agúndez, D., Gonzáles, S. (2003). Variabilidad Genética y Gestión Forestal. *Ecosistemas*, 12(3), 10-19.
- Belezaca, C., Suárez, C., Vera, D. (2011). Hongos fitopatógenicos asociados a la enfermedad de muerte regresiva y pudrición del fuste de pachaco (*Schizolobium parahybum*) en el trópico húmedo ecuatoriano. *Boletín Micológico*, 26(3), 15–22.
- Blanco-Flórez, J., Fernando-Trugilho, P., Tarcisio-Lima, J., Gherardi-Hein, P., Moreira Da Silva, Y. (2014). Characterization of young wood *Tectona grandis* L. F. planted in Brazil. *Madera Bosques*, 20(1), 11–20.
- Brito, S. (2015). *Análisis de la variabilidad genética de muestras ex vitro e in vitro de clones de Babaco (Vasconcellea × heilbornii var. pentagona Badillo) usando marcadores moleculares de Secuencias Internas Simples Repetitivas (ISSR)*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Universidad de las Fuerzas Armadas. Sangolquí, Ecuador. 96 p.
- Cárcamo, J. (2003). *Estudio técnico financiero de Tectona grandis y Swietenia humilis con micorriza en el Valle del Yeguaré, fco. Morazán, Honduras*. Tesis de Ingeniería Forestal. Escuela Agrícola Panamericana. Tegucigalpa, Honduras. 64 p.
- Carmona, M., Lemus, C., Rubio, C. (2002). *Estadística aplicada a la investigación* (p. 59). p. 59. Tepic: Universidad Autónoma de Nayarit. Tepic, Mexico. 59 p.
- Casas, A., Torres-Guevara, J., & Parra, F. (2017). *Domesticación en el continente americano: Investigación para el manejo sustentable de recursos genéticos en el Nuevo Mundo*. Moreliavalladolid. Morelia, Mexico. 579 p.
- Castro, J., Navarro, G., Cerdeira, L., Cobos, M. (2013). Purificación de ADN Genómico a partir de hojas, raíces y neumatóforos de *Mauritia flexuosa* “aguaje.” *Revista de La Sociedad Química Del Perú*, 79(3), 209–217.
- Chaudhari, C., Jha, S. Dhaka, R. (2018). *Genetic diversity analysis of teak in South Gujarat by RAPD marker* *Genetic diversity analysis of teak in South Gujarat by RAPD marker. International Journal of Chemical Studies* 6(6), 260–267.
- Cornejo, A., Serato, A., Rendón, B., Rocha, M. (2014). *Herramientas Moleculares Aplicadas en Ecología: Aspectos Teóricos y Prácticos*. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México, México. 274 p.



- Cruz, S., Romero, R., Cedeño, A., Verdosoto, A., Peñafiel, M., Canchignia, H. (2019). Densidad estomática, contenido de clorofila y relación filogenética en 17 cultivares de *Musa* spp. *Scientia Agropecuaria*. 10(1), 47-54.
- Doyle, J. Doyle, J. (1987). A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*.
- Fatima, T., Srivastava, A., Hanur, V., Rao, : (2018). An Effective Wood DNA Extraction Protocol for Three Economic Important Timber Species of India. *American Journal of Plant Sciences*. 9(1), 139-149.
- Fonseca, W. (2003). *Manual para productores de teca (Tectona grandis L. f) en Costa Rica*. Fondo Nacional de Financiamiento Forestal. Heredia, Costa Rica. 117 p.
- Grijalva, X., Ramos, R., Barrera, P., Vera, R., Sigcha, F. (2016). *Estado de los recursos genéticos forestales*. Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Quito, Ecuador. 102 p.
- Hansen, O., Changtragoon, S., Ponoy, B., Kjaer, E., Minn, Y., Finkeldey, R., Nielsen, K., Graudal, L. (2015). Genetic resources of teak (*Tectona grandis* Linn. f.)—strong genetic structure among natural populations. *Tree Genetics & Genomes* 11:802
- Invitrogen (2012) PureLink™ Genomic Plant DNA Purification Kit. Life Technologies Corporation. Carlsbad, Estados Unidos.
- Joshi, M., Deshpande, J. (2011). Polymerase Chain Reaction: Methods, Principles and Application. *International Journal of Biomedical Research*, 2(1), 81–97.
- Klug, W., Cummings, M., Spencer, C., Palladino, M. (2013). *Conceptos de genética: Décima edición*. Pearson Education. Madrid, España. 920 p.
- Kordrostami, M., Rahimi, M. (2015). Molecular markers in plants: Concepts and applications. *Genetics in the Third Millennium*, 13(2), 4024–4031.
- Kumar, S., & Gurusubramanian, G. (2011). Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers and its applications. *Science Vision*, 11(3), 116–124.
- Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
- Llanos L., Barrios, A., López, A. (2019). Variación genética en familias de polinización abierta de *Tectona grandis* L.f. en Colombia. *Colombia Forestal*, 22(2), 30–43.
- Meza, A., Rodriguez, J., Gatti, K., Espinoza, E. (2017). Propagación de arboles de teca *Tectona Grandis* L. f. por miniestacas. *Temas Agrarios*, 20(2), 43-48.
- Molina-freaner, F., Markow, E., Pfeiler, O., Rojas-soto, A., Varela-romero, A., Quijada-

- Mascareñas, M., & Esqueda, G. (2010). *Diversidad Biológica de Sonora*. Universidad Nacional Autónoma de México. México, México. 97-128 p.
- Molina-Quesada, S., Alfaro, C., Murillo, O., Badilla, Y., Luján, R. (2018). Evaluación del comportamiento de clones de *Tectona grandis* L. f. en suelos vertisoles de la Península de Nicoya, Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 16(38), 24–34.
- Murillo, O., Wright, J., Monteuis, O., & Montenegro, F. (2013). Mejoramiento genético de la teca en América Latina. Capítulo 6 en: *Aspectos técnicos de las inversiones de teca en America Latina*. Centro Agronómico Tropical de Investigaciones Agropecuarias. Turrialba, Costa Rica. 85-111 p.
- Nei, M. (1978). Estimation of Average Heterozygosity and Genetic Distance From A Small Number Of Individuals . *Genetics*, 89, 583–590.
- Nieto-Rodríguez, J., Hernandez-Delgado, S., Motte-Darricau, E., Mayek-Pérez, N. (2014). Analisis de la Diversidad genética del germoplasma de Teca (*Tectona grandis* L . f .) en Ecuador. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21), 109–121.
- Patel, S., Bosamia, T., Singh, P., Bhalani, H., Kumar, A. (2015). Polymerase Chain Reaction. *Magazine of Agricultural and Biological Sciences*, 13(9), 1996–1997.
- Piñero, D. (2008). La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. Capito 15 en: *Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad*. México, México. 437-496 p.
- Salinas, N. (2010). *Estudio de la variabilidad genética de Tres poblaciones de de piñon (Jatropha curcas L.) en la provincia de Manabí en la utilización de marcadores moleculares ISSR'S*. Tesis de Ingeniería en Biotecnología. Escuela Politécnica del Ejercito. Sangolquí, Ecuador. 85 p.
- Uyemoto, J., Zhang, Y., Kirkpatrick, B. (1998). A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 1(71), 40-45.
- Vaca, V. (2015). *Exportación de madera Teca: efecto económico y ambiental en el Ecuador*. Universidad de Guayaquil. Guayaquil, Ecuador. 87 p.
- Williams, G. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18:6531-6535.

## **CAPITULO VII**

### **ANEXOS**

## 7.1. Anexos

**Anexo 1.** Actividades realizadas en laboratorio.

**Fotografía 1.** Extracción de ADN.



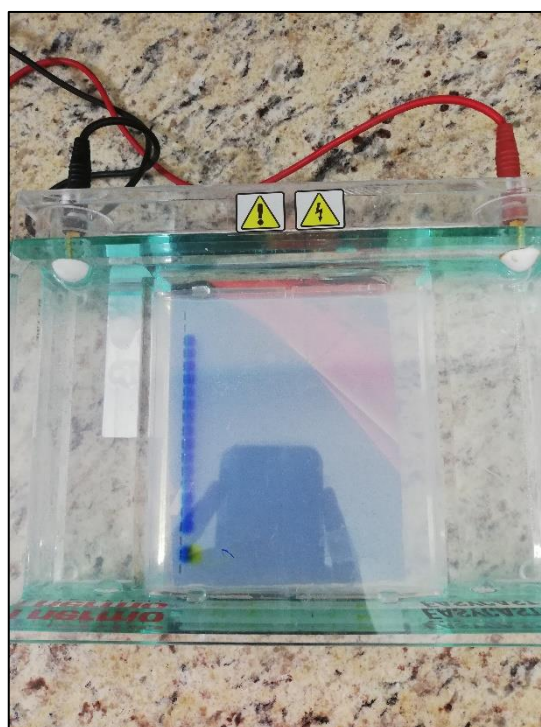
**Fotografía 2.** Comprobación de la extracción de ADN mediante electroforesis.



**Fotografía 3.** Preparación de la mix de PCR.



**Fotografía 2.** Comprobación de los productos de PCR mediante electroforesis.



## Anexo 2. Resultados de la evaluación de la calidad de ADN y su análisis de varianza.

| EVALUACION DE LA CALIDAD DE ADN POR PROTOCOLO |                       |               |                          |                      |
|-----------------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|----------------------|
|                                               | Uyemoto <i>et al.</i> | Doyle y Doyle | Dellaporta <i>et al.</i> | Purelink Genomic DNA |
| 1                                             | 100                   | 25            | 25                       | 75                   |
| 2                                             | 50                    | 75            | 50                       | 75                   |
| 3                                             | 75                    | 75            | 25                       | 100                  |
| 4                                             | 75                    | 75            | 25                       | 75                   |
| 5                                             | 25                    | 75            | 50                       | 75                   |
| 6                                             | 50                    | 75            | 75                       | 50                   |
| 7                                             | 75                    | 100           | 50                       | 50                   |
| 8                                             | 75                    | 100           | 50                       | 75                   |
| 9                                             | 25                    | 50            | 50                       | 75                   |
| 10                                            | 50                    | 50            | 75                       | 100                  |
| 11                                            | 50                    | 50            | 25                       | 100                  |
| 12                                            | 50                    | 75            | 75                       | 75                   |
| 13                                            | 100                   | 50            | 50                       | 75                   |
| 14                                            | 100                   | 50            | 25                       | 75                   |
| 15                                            | 100                   | 50            | 25                       | 50                   |
| 16                                            | 100                   | 25            | 50                       | 50                   |
| 17                                            | 100                   | 50            | 75                       | 50                   |
| 18                                            | 75                    | 25            | 50                       | 75                   |
| 19                                            | 75                    | 75            | 75                       | 75                   |
| 20                                            | 10                    | 75            | 25                       | 75                   |
| 21                                            | 75                    | 25            | 25                       | 75                   |
| 22                                            | 50                    | 50            | 50                       | 75                   |
| 23                                            | 75                    | 25            | 50                       | 75                   |
| 24                                            | 50                    | 25            | 25                       | 100                  |
| 25                                            | 100                   | 25            | 75                       | 100                  |
| 26                                            | 100                   | 50            | 50                       | 100                  |
| 27                                            | 75                    | 50            | 50                       | 75                   |
| 28                                            | 75                    | 50            | 25                       | 75                   |
| 29                                            | 100                   | 75            | 50                       | 75                   |
| 30                                            | 75                    | 25            | 75                       | 75                   |
| 31                                            | 75                    | 50            | 50                       | 50                   |
| 32                                            | 75                    | 50            | 25                       | 75                   |

### Análisis de la varianza

Variable N R<sup>2</sup> R<sup>2</sup> Aj CV  
 Columna2 16 0,71 0,63 14,11

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.     | SC      | gl | CM     | F    | p-valor |
|----------|---------|----|--------|------|---------|
| Modelo   | 2206,01 | 3  | 735,34 | 9,67 | 0,0016  |
| Columna1 | 2206,01 | 3  | 735,34 | 9,67 | 0,0016  |
| Error    | 912,16  | 12 | 76,01  |      |         |
| Total    | 3118,17 | 15 |        |      |         |

**Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=18,30312**

Error: 76,0132 gl: 12

| Columnal   | Medias | n | E.E. |     |
|------------|--------|---|------|-----|
| Purelink   | 75,00  | 4 | 4,36 | A   |
| Uyemoto    | 71,40  | 4 | 4,36 | A B |
| Doyle      | 53,91  | 4 | 4,36 | B C |
| Dellaporta | 46,87  | 4 | 4,36 | C   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

### Anexo 3. Resultados de la evaluación de la concentración de ADN y su análisis de varianza.

| EVALUACION DE LA CANTIDAD DE ADN POR PROTOCOLO (ng/ul) |                       |               |                          |                      |
|--------------------------------------------------------|-----------------------|---------------|--------------------------|----------------------|
| Nº                                                     | Uyemoto <i>et al.</i> | Doyle y Doyle | Dellaporta <i>et al.</i> | Purelink Genomic DNA |
| 1                                                      | 90                    | 50            | 30                       | 30                   |
| 2                                                      | 100                   | 80            | 40                       | 30                   |
| 3                                                      | 70                    | 80            | 40                       | 30                   |
| 4                                                      | 80                    | 90            | 30                       | 30                   |
| 5                                                      | 80                    | 70            | 50                       | 40                   |
| 6                                                      | 40                    | 100           | 60                       | 40                   |
| 7                                                      | 60                    | 100           | 80                       | 40                   |
| 8                                                      | 40                    | 100           | 60                       | 30                   |
| 9                                                      | 40                    | 60            | 70                       | 40                   |
| 10                                                     | 30                    | 50            | 40                       | 30                   |
| 11                                                     | 100                   | 50            | 50                       | 30                   |
| 12                                                     | 80                    | 60            | 70                       | 40                   |
| 13                                                     | 100                   | 50            | 60                       | 40                   |
| 14                                                     | 100                   | 60            | 50                       | 30                   |
| 15                                                     | 90                    | 60            | 40                       | 30                   |
| 16                                                     | 70                    | 40            | 50                       | 40                   |
| 17                                                     | 50                    | 60            | 60                       | 30                   |
| 18                                                     | 60                    | 50            | 50                       | 30                   |
| 19                                                     | 50                    | 90            | 40                       | 20                   |
| 20                                                     | 100                   | 90            | 50                       | 20                   |
| 21                                                     | 80                    | 50            | 60                       | 30                   |
| 22                                                     | 80                    | 90            | 60                       | 40                   |
| 23                                                     | 60                    | 40            | 70                       | 20                   |
| 24                                                     | 50                    | 30            | 50                       | 50                   |
| 25                                                     | 100                   | 60            | 50                       | 50                   |
| 26                                                     | 100                   | 70            | 70                       | 50                   |
| 27                                                     | 80                    | 60            | 60                       | 40                   |
| 28                                                     | 100                   | 60            | 40                       | 30                   |
| 29                                                     | 100                   | 50            | 70                       | 50                   |
| 30                                                     | 90                    | 70            | 70                       | 50                   |
| 31                                                     | 90                    | 70            | 60                       | 40                   |
| 32                                                     | 80                    | 60            | 70                       | 30                   |

## Análisis de la varianza

| Variable | N  | R <sup>2</sup> | R <sup>2</sup> Aj | CV    |
|----------|----|----------------|-------------------|-------|
| Columna2 | 16 | 0,78           | 0,72              | 16,17 |

### Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

| F.V.     | SC      | gl | CM      | F     | p-valor |
|----------|---------|----|---------|-------|---------|
| Modelo   | 3667,58 | 3  | 1222,53 | 13,92 | 0,0003  |
| Columna1 | 3667,58 | 3  | 1222,53 | 13,92 | 0,0003  |
| Error    | 1053,91 | 12 | 87,83   |       |         |
| Total    | 4721,48 | 15 |         |       |         |

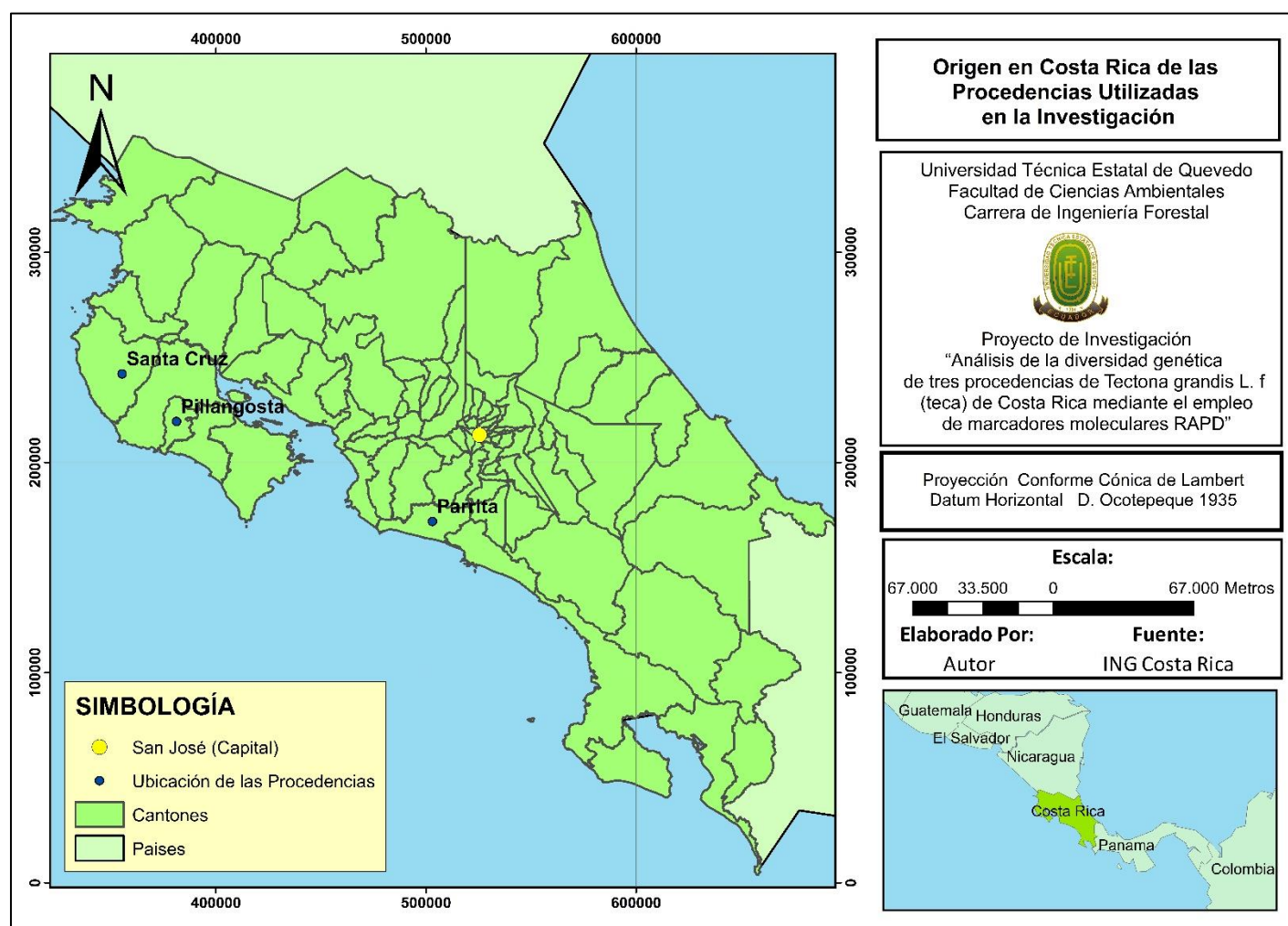
Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=19,67393

Error: 87,8255 gl: 12

| Columna1      | Medias | n | E.E. |     |
|---------------|--------|---|------|-----|
| Uyemoto       | 76,25  | 4 | 4,69 | A   |
| Doyle y Doyle | 65,63  | 4 | 4,69 | A B |
| Dellaporta    | 54,69  | 4 | 4,69 | B C |
| Purelink      | 35,31  | 4 | 4,69 | C   |

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ( $p > 0,05$ )

## Anexo 3. Origen en Costa Rica de las procedencias evaluadas.





**Anexo 4.** Ubicación en Ecuador de las procedencias evaluadas.

