

CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO

RECIBIDO
17 01 1999
Turrialba, Costa Rica

CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE
GENOTIPOS SILVESTRES DE *Quassia amara* L. ex Blom
DE CENTROAMERICA

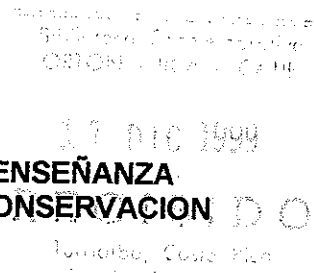
POR

YANIRA ELIZABETH LOPEZ VENTURA

CATIE

Turrialba, Costa Rica
1999

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACION PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO**



**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS SILVESTRES
DE *Quassia amara* L. ex Blom DE CENTROAMÉRICA**

POR:

YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

TURRIALBA, COSTA RICA

1999

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSGRADO**

**CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE GENOTIPOS SILVESTRES
DE *Quassia amara* L. ex Blom DE CENTROAMÉRICA**

**Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de
Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de
Investigación y Enseñanza como requisito parcial para optar por el grado de:**

Magister Scientiae

Por:

YANIRA ELIZABETH LÓPEZ VENTURA

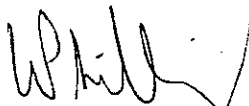
Turrialba, Costa Rica

1999

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

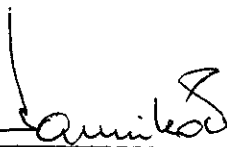
FIRMANTES:



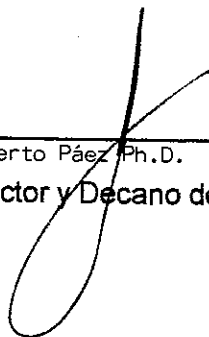
Wilberth Phillips M.Sc.
Consejero Principal



Francois Anthony Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Daniel Marmillo Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Gilberto Páez Ph.D.
Director y Decano de la Escuela de Posgrado



Yanira Elizabeth López Ventura
Candidato

DEDICATORIA

A mis padres:

Amanda Ventura

Mario López

Con amor por su esfuerzo y apoyo en todo momento.

A mis hermanos y hermanas:

Wilfredo, Thelma, Fabricio, Cristy, Rolando y Glenda

Con amor por su apoyo y ayuda de siempre.

A mis abuelos:

Eugenio Ventura y María de La Paz Hernández

Con amor por su ejemplo de dedicación y esfuerzo.

A mi sobrino

Con cariño.

A mis tíos y tías, primos y primas.

Con mucho cariño

AGRADECIMIENTOS

Mis más sinceros agradecimientos a todas aquellas personas que de alguna u otra manera contribuyeron al desarrollo de esta investigación. Desde la planificación de la investigación hasta la edición de este documento.

Con especial agradecimiento a:

Wilberth Phillips por sus consejos, asesoría técnica y científica, por su tiempo y dedicación incondicional durante el desarrollo de toda esta investigación. Y por su amistad y apoyo en los momentos más difíciles.

Daniel Marmillod, por su amistad, asesoría y apoyo en el desarrollo de la fase de campo, y a la cooperación de su equipo de trabajo del proyecto Olafo. Especialmente a José Masís.

Francois Anthony por su apoyo y asesoría técnica y científica en la fase de laboratorio, por sus acertadas sugerencias en el desarrollo de esta investigación.

Al personal de la Unidad de Biotecnología y Recursos Fitogenéticos del CATIE, por su colaboración en el desarrollo de esta investigación. Especialmente a William Araya y a Olman Quiros, por sus sugerencias y ayuda incondicional en la fase de laboratorio.

Al personal de la Biblioteca, la Escuela de Posgrado y la Unidad de Informática, especialmente a Johnny Pérez, por su apoyo en el procesamiento de los datos.

Al programa regional del Servicio de Intercambio Alemán (DAAD) y al Gobierno de Holanda por haber contribuido económicamente para el desarrollo de este proceso.

A todas las personas que siguieron de cerca el desarrollo del trabajo y que colaboraron para la realización de las colectas de material en todos los sitios visitados en Centroamérica.

A María José y Gerardo por su cariño y apoyo durante estos dos años de estudio y trabajo.

CONTENIDO

	Pag.
CONTENIDO	v
RESUMEN	ix
SUMMARY	xi
LISTA DE CUADROS	xiii
LISTA DE FIGURAS	xv
LISTA DE APENDICES	xvi
1. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivos	3
1.2. Hipótesis	3
2. REVISION DE LITERATURA	4
2.1. Generalidades de <i>Quassia amara</i> L. ex Blom	4
2.1.1. Clasificación taxonómica	4
2.1.2. Descripción botánica	4
2.1.2.1. Corteza y madera	5
2.1.2.2. Hojas	5
2.1.2.3. Flor	5
2.1.2.4. Fruto	5
2.1.2.5. Semilla	6
2.1.3. Nombres comunes	6
2.1.4. Distribución geográfica	6
2.1.4.1. Distribución de <i>Q. amara</i> en Costa Rica	7
2.1.5. Usos de <i>Q. amara</i>	8
2.1.5.1. Medicinal	8
2.1.5.2. Insecticida	9
2.1.5.3. Madera	9
2.2. Caracterización de germoplasma	10
2.2.1. Generalidades	10

2.2.2. Caracterización morfológica	10
2.2.3. Caracterización molecular	13
2.2.3.1. Análisis PCR /RAPDs	16
2.2.3.2. Descripción de la metodología RAPD	17
2.3. Relación entre LA caracterización morfológica y molecular	21
2.4. Análisis estadístico	23
2.4.1. Tamaño de la muestra	23
2.4.2. Análisis de conglomerados	24
2.4.3. Valor discriminante de los caracteres	25
2.4.4. Asociación entre variables	26
2.4.5. Análisis de datos moleculares	28
2.4.5.1. Distancia genética	29
2.4.5.2. Índice de similitud	29
2.4.5.3. Dendogramas	30
2.4.5.4. <i>Bootstrap</i>	31
3. MATERIALES Y METODOS	32
3.1. Fase de campo	35
3.1.2. Material experimental	35
3.1.3. Colecta del material experimental	35
3.1.4. Datos de pasaporte	36
3.1.5. Selección de los descriptores morfológicos	37
3.1.6. Evaluación de los descriptores morfológicos	37
3.1.6.1. Hojas	37
3.1.6.2. Flor	38
3.1.6.3. Fruto	39
3.1.6.4. Semilla	39
3.1.7. Elaboración del formulario de evaluación	39
3.1.8. Análisis estadístico	40
3.1.8.1. Matriz de similitud, distancia y estructura taxonómica	40
3.1.8.2. Determinación del valor discriminante	40
3.1.8.3. Tamaño de muestra	42

3.2. Fase de laboratorio	44
3.2.1. Material experimental	44
3.2.2. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN.	44
3.2.3. Procedimiento RAPDs	45
3.2.4. Visualización de los productos de la amplificación	47
3.2.5. Análisis estadístico de los datos moleculares	48
3.2.5.1. Matriz de similitud y distancias genéticas	48
3.2.5.2. " Bootstrap"	50
4. RESULTADOS Y DISCUSION	51
4.1. Fase de campo	51
4.1.1. Sitios de colecta	51
4.1.2. Descriptores morfológicos	56
4.1.2.1. Descriptores de la hoja	57
4.1.2.2. Descriptores de la flor	58
4.1.2.3. Descriptores del fruto y de la semilla	58
4.1.3. Material Vegetal	63
4.1.4. Caracterización morfológica	64
4.1.4.1. Agrupamiento de los individuos según los datos morfológicos	64
4.1.4.2. Estructura de los agrupamientos	65
4.1.5. Valor discriminante de los caracteres para separar grupos	68
4.1.5.1. Caracteres cualitativos	68
4.1.5.2. Caracteres cuantitativos	70
4.1.5.3. Análisis discriminante canónico	72
4.1.6. Tamaño de muestra	75
4.1.6.1. Hoja	75
4.1.6.2. Flor	76
4.1.6.3. Fruto	76
4.1.6.4. Semilla	76
4.2 Fase de laboratorio	78
4.2.1. Extracciones de ADN	78

4.2.2. Caracterización molecular	80
4.2.3. Definición de grupos genéticos	80
5. CONCLUSIONES	92
6. RECOMENDACIONES	94
7. BIBLIOGRAFIA	95
APENDICES	105

LOPEZ, Y. 1999. Caracterización Morfológica y Molecular de *Quassia amara* L. ex Blom de Centroamérica. Tesis Msg. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 118 p.

Palabras clave: *Quassia amara*, *Quassia*, Caracterización, Marcadores moleculares, recursos genéticos, diversidad genética.

RESUMEN

El hombre grande (*Quassia amara*) es un arbusto propio del sotobosque de los trópicos húmedos americanos, cuya parte útil es la madera (tallo) que se extrae periódicamente, por lo cual es considerado un producto no maderable del bosque. Esta planta ha sido explotada en forma silvestre durante muchos años, debido a sus propiedades medicinales y en la actualidad, por sus propiedades como insecticida natural. Centroamérica es uno de los sitios de dispersión natural y de utilización más importante de la especie.

En investigaciones anteriores se estudió la variabilidad genética de la especie desde el punto de vista morfológico (Upegui, 1998), pero aún falta información al nivel del ADN. Las técnicas moleculares podrían dar un conocimiento más intenso y detallado de los genotipos, que permitiría definir tácticas de conservación y establecer programas de aprovechamiento y mejoramiento genético mejor sustentados de la especie.

En esta investigación se caracterizó morfológica y molecularmente 17 genotipos silvestres de *Q. amara* del área centroamericana, provenientes en su mayoría de Costa Rica, pero también de Panamá, Nicaragua, Honduras, El Salvador y Guatemala.

Para la caracterización morfológica se elaboró una lista de 36 descriptores. Se hizo énfasis en las características de la hoja, porque a diferencia de los otros órganos, están presente en las plantas silvestres en todas las épocas del año. Se evaluaron 21 parámetros de hoja, ocho de flor, ocho de fruto y tres de semilla. Solo en tres poblaciones se evaluaron otros órganos además de hojas, por mostrar disponibilidad al momento de la visita.

Con base en los datos morfológicos, los genotipos se agruparon en dos grupos, y éstos a su vez en dos subgrupos que guardan alguna relación con su posición geográfica. El subgrupo A1 está conformado principalmente por árboles de sitios ubicados en el Pacífico, y el subgrupo A2 está constituido en su mayoría por árboles de Honduras y El Salvador. Por otra parte, el subgrupo B1 incluye individuos de diversos sitios, y el subgrupo B2 está formado principalmente por árboles de Talamanca, Costa Rica y de Parque Soberanía y Barro Colorado, Panamá, la mayoría de ellos con influencia Atlántica. En todos los grupos se encontraron árboles mezclados.

La característica cualitativa que discriminó más entre grupos fue el color del punto de inserción del foliolo terminal. Los descriptores cuantitativos con mayor valor discriminante fueron la longitud de los foliolos terminal e izquierdos 1 y 2 y las variables generadas a partir de longitud y ancho de estos foliolos. Las variables canónicas discriminantes CAN1 y CAN2 explicaron el 86% de la variabilidad total de las variables.

Para la caracterización molecular, se trabajó con 17 genotipos provenientes de los mismos sitios de colecta que en la caracterización morfológica. Se utilizó la técnica PCR-RAPD. Se encontró que de 503 *primers* o iniciadores analizados, 72 presentaron buena amplificación del ADN, el 17% mostró bandas polimórficas (de 1 hasta 11 bandas). Con esta información se calcularon índices y matrices de distancia, dendogramas y análisis bootstrap, entre los genotipos y entre los grupos formados.

No se encontró un patrón que relacione en forma definitiva, la afinidad genética de los materiales evaluados, con la posición geográfica de la cual proceden. Esto confirma lo indicado por Porter (1972) y Brown (1995), en el sentido de que es difícil determinar claramente cual es la distribución natural de *Q. amara*, por ser una especie utilizada desde tiempos inmemoriales en casi todo el continente por sus propiedades medicinales. Sin embargo, se observó que los genotipos de la zona Atlántica centroamericana y norte de Costa Rica, tienden en términos generales, a agruparse juntos, al igual que los materiales provenientes de la costa Pacífica de Centroamérica. De la misma manera, los genotipos de Soberanía y Barro Colorado, ambos de Panamá, guardan una estrecha relación genética con el genotipo de Kéköldi (Talamanca, Costa Rica). Al respecto los resultados fueron coincidentes con los encontrados con el análisis morfológico.

Se identificaron bandas polimórficas diferentes y comunes entre grupos. La mayor distancia genética (0,66) se encontró entre los genotipos con influencia del Atlántico (Subgrupo A2) con respecto a un genotipo del Pacífico (Subgrupo B2). La menor distancia genética (0,20) se encontró entre los genotipos del subgrupo A1 (sin zona geográfica definida) y los del Subgrupo B1, con influencia del Pacífico.

Podría concluirse que en la agrupación de los genotipos centroamericanos de *Q. amara*, coinciden dos factores en forma simultánea: una separación de los mismos según el origen Pacífico o Atlántico, y por otra parte, la influencia de dos posibles acerbos genéticos dentro de la población, uno procedente del Norte y representada principalmente por las poblaciones de El Salado (Honduras), Chirilagua (El Salvador) y La Lupe (Nicaragua), y otro conformado por poblaciones representadas típicamente por Barro Colorado, Soberanía y Kéköldi. En Costa Rica ambos acerbos podrían encontrarse mezclados geográficamente, lo cual produce confusión al intentar definir una relación entre la ubicación geográfica y genética de ciertos materiales. Estas hipótesis tendrán que ser comprobadas incluyendo otras procedencias en próximos estudios.

LOPEZ, Y. 1999. Morphological and Molecular Characterization of Central America's *Quassia amara* L. ex Blom. Thesis Mag. Sci. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Keywords: *Quassia amara*, *Quassia*, Characterization, molecular markers, RAPD, genetic resources, genetic diversity

SUMMARY

Quassia amara is a bush found at the understory of the American humid tropics, which usable part is its wood (stem) that is periodically extracted and thus considered a non-woody forest product. This plant has been exploited for many years due to its medical properties and currently as a natural insecticide. Central America is one of *Quassia amara*'s most important natural dissemination and utilization sites.

Prior investigations studied the species genetic variability from a morphological point of view (Upegui, 1998), but there is still lack of information at DNA level. Molecular techniques could provide a deeper and more detailed knowledge of the genotypes that would allow to define conservation strategies and to establish better development and genetic improvement programs.

Through this research, it was possible to conduct a morphological and molecular characterization of 17 *Q. amara* wild genotypes from the Central American region, mainly from Costa Rica but also from Panama, Nicaragua, Honduras, El Salvador and Guatemala.

For the species morphological characterization, a list of 36 descriptors was elaborated. Emphasis was given to leave's characteristics as, contrary to other organs, they are present in wild plants during the whole year. Twenty-one leaf parameters were evaluated, eight corresponding to flowers, eight to the fruits and three to seeds. Only in three populations other organs besides the leaves were evaluated because they were available at the time of the visit. //

Base on morphological information, genotypes were grouped in two and these were also divided into two subgroups keeping some relationship with their geographic location. The A1 subgroup was formed mainly by trees from the Pacific zone and the A2 subgroup was constituted mainly by trees from Honduras and El Salvador. On the other hand, the B1 subgroup included individuals from several sites and the B2 subgroup was composed mainly by trees from Talamanca, Costa Rica and the Soberanía Park and Barro Colorado, Panamá; most of them with Atlantic influence. Mixed trees were found in all the groups.

The most discriminative quality trait among the groups was the color of the terminal foliole insertion point. The quantitative descriptors with highest discriminative value were the terminal and 1 and 2 left leaflets' length and the variables generated from the leaflets length and width. The discriminant CAN1 and CAN2 canonic variables explained the 86% of the variables total variability.

The molecular characterization was accomplished using 17 genotypes from the same collecting sites used for the morphological characterization. The PCR-RAPD technique

was employed. It was found that from 503 primers analyzed, 72 showed good DAN amplification and 17% presented polymorphic bands (from 1 up to 11 bands). With this data indexes and distance, dendograms and bootstrap analysis matrixes were estimated between genotypes and groups.

It was not possible to find a pattern relating in a definite way the genetic affinity of evaluated materials with their geographical location. This confirms the information reported by Porter (1972) and Brown (1995), in the sense that it is difficult to clearly determine the natural distribution of *Q. amara* as this is a species utilized since ancient times in almost the whole continent due to its medical properties. However, it was observed that genotypes from Central America's Atlantic zone and north of Costa Rica, tend, in general terms, to group together as do the materials from the Pacific coast of Central America. Likewise, genotypes from Soberania and Barro Colorado, both from Panama, keep a close genetic relationship with the Kéköldi (Talamanca, Costa Rica) genotype. To this regard, the results coincided with those found for the morphological analysis.

Different polymorphic bands as well as others common to all the groups were identified. The biggest genetic distance (0,66) was found between the genotypes with Atlantic influence (A2 Subgroup) and the Pacific genotypes (B2 Subgroup). The smallest genetic distance (0,20) was found between the genotypes from the A1 subgroup (without a defined geographical zone) and the B1 Subgroup with Pacific influence.

It could be concluded that in grouping of *Q. amara* Central America's genotypes two factors coincide simultaneously: their division according to their Pacific or Atlantic origin and also the influence of two possible genetic sources within the populations, one from the north represented mainly by El Salado (Honduras), Chirilagua (El Salvador) and La Lupe (Nicaragua) populations and the other formed by the populations typically represented by Barro Colorado, Soberania and Kéköldi. In Costa Rica both sources could be found geographically and genetically mixed in certain materials. These hypotheses should have to be validated including other provenances for future investigations.

LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta para la caracterización morfológica y molecular de las poblaciones silvestres de <i>Q. amara</i> en Centroamérica.	34
Cuadro 2. Fecha de colecta y material vegetal evaluado de <i>Q. amara</i> en cada sitio de muestreo..	63
Cuadro 3. Distribución por grupo de individuos de <i>Q. amara</i> según análisis de varianza mínima de Ward...	64
Cuadro 4. Estados de los descriptores cualitativos seleccionados para hoja en la caracterización de <i>Q. amara</i> ...	68
Cuadro 5. Características cualitativas de hoja por sitio con mayor frecuencia y porcentaje en poblaciones silvestres de <i>Quassia amara</i>	69
Cuadro 6. Análisis de los caracteres cualitativos de la hoja de <i>Quassia amara</i> .70	
Cuadro 7. Promedio, valor discriminante "D" y "Dw" para los caracteres cuantitativos de hojas, en el agrupamiento de individuos de <i>Quassia amara</i> .	71
Cuadro 8. Variables canónicas CAN1 y CAN2 de la separación de grupos en la caracterización morfológica de <i>Quassia amara</i> ..	73
Cuadro 9. Número de plantas por sitio de muestreo para la caracterización morfológica de poblaciones silvestres de <i>Quassia amara</i> ..	75
Cuadro 10. Número de hojas por arbusto por sitio para la caracterización de <i>Q. amara</i> . 95%.	76
Cuadro 11. Número de flores por planta por sitio para la caracterización de poblaciones silvestres de <i>Q. amara</i>	76
Cuadro 12. Número de frutos por planta por sitio para la caracterización de poblaciones silvestres de <i>Q. amara</i> .	77
Cuadro 13. Número de semillas por arbusto y número de arbustos por sitio, para la caracterización de poblaciones silvestres de <i>Q. amara</i> .	77
Cuadro 14. Lista de "primers" polimórficos identificados para la caracterización	

molecular de <i>Q. amara</i> , utilizando marcadores RAPDs.	83
Cuadro 15. Número de loci polimórficos y frecuencia en porcentaje por grupo de genotipos de <i>Q. amara</i> .	88
Cuadro 16.. Loci polimórficos comunes (debajo diagonal) y loci diferentes (sobre la diagonal) entre agrupaciones de genotipos de <i>Quassia amara</i>	89
Cuadro 17. .Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los cuatro grupos de la clasificación obtenida para los genotipos de <i>Quassia amara</i> .	89

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres <i>Quassia amara</i>	33
Figura 2. Diagrama de flujo para el análisis de datos obtenidos mediante la caracterización morfológica de <i>Quassia amara</i> . (Tapia, 1998)	41
Figura 3. Diagrama de flujo para el análisis de datos moleculares generados mediante la metodología RAPDs en la caracterización molecular de <i>Quassia amara</i> . (Tapia, 1998)	49
Figura 4. Descriptores de la hoja de <i>Quassia amara</i> .	59
Figura 5. Hojas de <i>Quassia amara</i> con diferente número de folíolos	60
Figura 6. Descriptores del fruto de <i>Quassia amara</i>	61
Figura 7. Descriptores de la hoja de <i>Quassia amara</i>	62
Figura 8. Fenograma obtenido por el agrupamiento jerárquico de Ward de <i>Quassia amara</i> basado en distancias de Gower (1967)	66
Figura 9. Distribución de los arbustos de <i>Quassia amara</i> en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower	74
Figura 10. Ejemplo de una amplificación de ADN y polimorfismos de los genotipos de <i>Quassia amara</i> con la técnica RAPDs y el "primer" OPB-06 1,0 μ M.	81
Figura 11. Ejemplo de una amplificación de <i>Quassia amara</i> con la técnica RAPD y el "primer" OPE-01 0,1 μ M	81
Figura 12. UPGMA dendrograma y bootstrap (2000 repeticiones) de el agrupamiento de genotipos de <i>Quassia amara</i> provenientes de Centroamérica, según la matriz de distancia y similitud de Nei (1979)	82
Figura 13. Dendrograma UPGMA (1000 réplicas) de cuatro grupos de genotipos de <i>Quassia amara</i> basado en la Distancia genética de Nei (1978)	88

LISTADO DE APENDICES

	Pag.
Apéndice 1. Método de extracción de ADN de los genotipos de <i>Quassia amara</i>	106
Apéndice 2. Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa.	107
Apéndice 3. Composición de la solución tampón TE108	
Apéndice 4. Preparación de la solución maestra (Master Mix)	108
Apéndice 5. Formulario para la toma de datos para la caracterización morfológica de <i>Quassia amara</i>	109
Apéndice 6. Descriptores de los caracteres morfológicos seleccionados para la caracterización morfológica de poblaciones silvestres de <i>Quassia amara</i>	112
Apéndice 7. Cuadro de diversidad genética de las poblaciones de <i>Quassia amara</i> . Popgene	116

1. INTRODUCCIÓN

El bosque tropical es muy rico en productos no maderables (PNMB) que incluyen desde exudados (gomas, resinas, látex), hasta cañas, frutos, vegetales comestibles, hongos, especias, carnes, animales de caza, mascotas y plantas de uso farmacéutico (Villalobos y Ocampo, 1997). La explotación indiscriminada de muchos de estos recursos, ha puesto en peligro su existencia y ha causado una reducción en la disponibilidad de algunos de ellos. Para asegurar su sobrevivencia, la población debe buscar alternativas de manejo sostenible de los mismos, para lo cual uno de los primeros pasos es contar con suficiente información que permita tomar decisiones acertadas con respecto a su manejo.

El hombre grande (*Quassia amara*) es un arbusto propio del sotobosque de los trópicos húmedos americanos, cuya parte útil es la madera (tallo) que se extrae periódicamente. Esta planta ha sido explotada en forma silvestre durante muchos años debido a sus propiedades medicinales y más recientemente por sus propiedades como insecticida natural, por lo que se le considera un producto no maderable del bosque (Standley, 1937).

La explotación de esta especie tiende a incrementarse, y junto con el aumento en los procesos de expansión de la población y el deterioro general del medio ambiente, han puesto en peligro los nichos naturales donde la planta se desarrolla, amenazando así su diversidad y las posibilidades futuras para llevar a cabo su explotación a mayor escala.

Desde hace algunos años, en el CATIE se han realizado investigaciones tendientes a conocer mejor la especie (Villalobos, 1995; Leigue, 1997; Upegui, 1998). El proyecto "Conservación para el Desarrollo Sostenible en América Central", Olafo, ha realizado investigaciones destinadas a evaluar el potencial de cuasia dentro de los sistemas productivos de ciertas comunidades (Marmillod *et al.* 1995). Además se han realizado estudios sobre la ecología, manejo y composición de la especie, así como un inventario de la población de plantas existente en la reserva indígena Kéköldi en Talamanca, Costa Rica.

En otras investigaciones realizadas en Costa Rica, se ha estudiado la extracción y comportamiento cromatográfico de extractos de cuasia sobre la mosca blanca (*Bemisia tabaci*) y sobre el pulgón verde (*Myzus persicae* Silz.), así como la actividad farmacológica y gastrointestinal del extracto acuoso de la madera en ratas y ratones (García *et al.* 1997, Badilla *et al.* 1998). También se han estudiado aspectos sobre la biología reproductiva de la planta, su calidad de semilla y su crecimiento (Leigue, 1997). Se han iniciado estudios sobre el estado fitopatológico de las plantas en vivero y en el bosque, y sobre las propiedades biocidas de *Q. amara* (Badilla *et al.* 1998).

Un paso fundamental que requiere de más investigación, es el conocimiento de la variabilidad genética que presenta *Q. amara*, sobre todo en el área centroamericana, que es uno de los sitios de dispersión natural y de utilización más importante. En anteriores investigaciones se ha estudiado esta variabilidad desde el punto de vista morfológico (Leigue, 1997; Upegui, 1998), pero aún no se han realizado estudios a nivel del ADN. En ese sentido, las técnicas moleculares podrían dar un conocimiento más intenso y detallado de los genotipos, que lo que actualmente se obtiene usando características morfológicas.

En esta investigación se pretendió caracterizar morfológica y molecularmente con marcadores moleculares RAPDs, un grupo de genotipos silvestres del área centroamericana. Se buscó también, determinar la composición genética de la población estudiada y la definición de posibles grupos genéticos.

La información generada será importante para establecer programas de aprovechamiento y mejoramiento genético de la especie, y en la definición de tácticas de conservación. Esto debería redundar en una reducción en la presión sobre el bosque y en una explotación más racional de este valioso recurso vegetal.

1.1. Objetivos

General:

Estudiar la diversidad genética de materiales silvestres de *Quassia amara* provenientes de Centroamérica, mediante su caracterización morfológica y molecular con el uso de marcadores moleculares RAPDs.

Específicos:

- Definir algunos descriptores morfológicos para caracterizar *Quassia amara* bajo condiciones *in situ*.
- Caracterizar genotipos silvestres de diferentes localidades en Centro América usando la lista de descriptores definida.
- Caracterizar molecularmente los mismos genotipos usando la técnica RAPD.
- Relacionar la distribución geográfica de los genotipos con su afinidad genética.
- Estudiar la estructura de la diversidad genética dentro y entre poblaciones.

1.2. HIPOTESIS

- Los descriptores seleccionados posibilitan una aceptable caracterización morfológica, de genotipos de *Q. amara*.
- Los marcadores moleculares RAPD son eficientes para caracterizar molecularmente los genotipos de *Q. amara*.
- Los descriptores morfológicos y los moleculares permiten conocer razonablemente bien la estructura genética de las poblaciones de *Q. amara* y su relación con la distribución geográfica.
- Existe una relación estrecha entre resultados de marcadores moleculares y los morfológicos.

2. REVISION DE LITERATURA

2.1. GENERALIDADES DE *Quassia amara* L. ex Blom

Quassia amara L. ex Blom comúnmente conocida como "hombre grande", es una especie no maderable originaria del trópico americano, en donde tiene alguna importancia económica (Poveda, 1995). Es un recurso natural aprovechado desde tiempos ancestrales, principalmente como medicina. Su utilidad como plaguicida natural se reconoce desde el siglo XIX (Ocampo, 1995; Kent y Ammour, 1995; Standley, 1937; Grainge y Ahmed, 1988; Thomas, 1990; Villalobos y Ocampo, 1997).

2.1.1. Clasificación taxonómica

La especie se clasifica de la siguiente manera:

Orden : Sapindales

Familia: Simaroubaceae

Subfamilia: Simaruboideae

Género: *Quassia*

Especie: *amara*

Nombre científico: *Quassia amara*

2.1.2. Descripción botánica

Es un arbusto de 3-6 metros de altura, aunque en algunos sitios es posible encontrar especímenes de 8-10 metros.

De acuerdo con Standley, (1937); Standley y Steyermark, (1946); Nootboom (1962); Porter (1972); Holdridge y Poveda (1975); Cáceres, *et al.* (1995); Brown (1995), Ling (1995), y Ocampo *et al.* (1997) *Q. amara* posee las siguientes características:

2.1.2.1. Corteza y madera:

Corteza grisácea, finamente fisurada verticalmente. La madera es blanca o amarillenta, inodora con sabor amargo, ligera, fácil de cortar y resistente a los insectos. Rebrotará fácilmente, savia incolora, muy amarga. El régimen lumínico se relaciona positivamente con el color y densidad de la madera.

2.1.2.2. Hojas

Imparipinadas, alternas, pecíolo y raquis alados, folíolos sésiles, opuestas, acuminadas, 5 a 11 cm (longitud) y 4 a 7 cm (ancho), color verde intenso en el haz y verde claro en el envés, cuando jóvenes de color pardo rojizas, brotes rojizos.

2.1.2.3. Flor

Planta monoica, con flores perfectas y hermafroditas. Racimos que pueden ser axilares o terminales, flores rojo brillante o rosa, cónicas y alargadas, perfectas con cinco sépalos libres, imbricadas. Un cáliz de 2-3 mm de largo de segmentos ovados, obtusos, ciliados; cinco pétalos de 2,5 a 4,5 cm, lineales lanceolados, glabros; diez estambres usualmente más grandes que la corola; gineceo de cinco carpelos apocarpos, un óvulo por lóculo con placentación axial. La floración ocurre entre setiembre y marzo, para esto requiere de la exposición a la luz (Brown, 1995; Ling, 1995).

2.1.2.4. Fruto.

Drupa apocárpica uniseminada con el receptáculo inflado. Generalmente cinco o menos drupas ovoides negras, de 1-1,5 cm de longitud, sobre un receptáculo rojo ancho, con las semillas suspendidas de la punta. Esto indica que el ovario es una sola unidad unilocular, que se divide a causa del desarrollo del fruto y del crecimiento del receptáculo. La fructificación ocurre aproximadamente dos meses después de iniciada la floración, principalmente de noviembre a mayo.

2.1.2.5. Semilla

Pendulares, con testa membranosa, cotiledones plano-convexos, carnosos, radícula muy corta y retraída.

2.1.3. Nombres comunes

Q. amara es conocida también como: amargo, cuasia, cuasia de Caiena, cuasia amarga, pau amarelo, pau quassia, quassia-wood, wewe gifi, cuasia de Surinam, hombre grande, limoncillo, puesilde, bitter wood, palo quinina, guavito, quiniclú, guavito amargo, palo de hombre, hombrón, cuasia, guabo, jamaica bark, palo muneco, ruda, simaruba, Surinam wood, crucete (Cáceres *et al.* 1995).

2.1.4. Distribución geográfica

Es difícil determinar claramente cual es la distribución natural de *Q. amara*, porque ha sido cultivada en muchas regiones indígenas por sus propiedades y usos. Según diferentes autores se encuentra distribuida desde el norte de Brasil, Argentina, Surinam, Guayana, Venezuela, Colombia y Panamá. También se informa su presencia en Centroamérica y en el Sur de México (Cronquist, 1944; Porter, 1972; Brown, 1995).

Para algunos países es posible encontrar mayor información acerca de la distribución y usos de la especie como en Panamá, Colombia y Costa Rica. En este último país existe mayor información disponible probablemente, porque esta especie ha sido objeto de varios estudios desde hace algunos años por parte del CATIE- Proyecto de Conservación para el Desarrollo Sostenible en América Central (Olafo).

En Panamá se le puede encontrar en la zona del canal, Bocas del Toro, Colón, Chiriquí, Veraguas, Coclé, Panamá y Darién en el bosque seco Tropical (Croat, 1978). En el Norte de Colombia se ha informado la presencia de *Q. amara*, en los departamentos de Atlántico, Bolívar, Magdalena y Santander (García, 1992).

2.1.4.1. Distribución de *Q. amara* en Costa Rica

Según Villalobos (1995), el principal condicionador de la distribución natural de *Q. amara* en Costa Rica es la altitud, sin presentarse poblaciones importantes de cuasia por encima de 500 msnm. Sin embargo, Brown (1995), menciona que en el Herbario Nacional de Costa Rica y en el Jardín Botánico de Missouri, se informa que es posible encontrarla desde el nivel del mar hasta los 900 m. La humedad del suelo durante el año es el segundo factor en la distribución de cuasia, pues no soporta períodos secos largos y solo puede sobrevivir en el bosque seco tropical en condiciones de bosque de galería, en cualquier punto. Dentro de una población que ocupa un área geográfica determinada, la especie se agrupa a la vez en aglomerados, cuyo distanciamiento, forma, tamaño y densidad dependerá de la disponibilidad de agua y luz, a través del tiempo, en cada uno de sus puntos.

En estudios realizados por el proyecto CATIE-Olafo (1997), el principal parche de cuasia en la región Atlántica está ubicado en la reserva indígena Kéköldi, en Talamanca, junto al poblado costero de Puerto Viejo, cerca de la frontera con Panamá. En la subvertiente Norte es factible encontrar cuasia en toda la llanura de San Carlos, que abarca la región por debajo de los 500 msnm desde el río Pocosol hasta el río Sarapiquí.

En el Pacífico Central y Sur, se encuentra cuasia en la zona de transición en el Pacífico seco y el lluvioso, en los sectores de Orotina y la Reserva Biológica Carara, cercana a la costa; en esta última la presencia se restringe al sector de lomas en condiciones de bosque secundario. Al norte de Carara, con bosques secundarios extensos, se encuentran agrupaciones de arbustos, algunos de gran tamaño, aisladas entre sí y con densidades y dimensiones variadas (CATIE-Olafo, 1997). La localidad natural de cuasia, de mayor altitud, según la información de los herbarios, está cerca del cerro La Cangreja en Puriscal; ahí se encuentran arbustos hasta unos 350 msnm. Entre esta región y el poblado de Parrita, en el Pacífico Sur, se encuentran pequeños grupos aislados de arbustos, aún en áreas de pastizal.

2.1.5. Usos de *Q. amara*

A continuación se describen los usos más comunes de la planta.

2.1.5.1. Medicinal

Es muy conocido que muchas propiedades biológicas interesantes de las Simaroubaceas están asociadas con sus principios amargos. Particularmente, en las últimas décadas esta familia de plantas ha recibido mayor atención debido a la actividad anticancerígena que presentan algunos cuasinoides (Grandolini, 1987).

El uso medicinal de *Q. amara* es el más común y tradicional dado por comunidades indígenas y la población en general, en muchos sitios de Costa Rica, Honduras, El Salvador, Nicaragua y Panamá (Torres, 1994; González y Trabanino, 1994). Se usa como un baño de hojas contra el sarampión, también para enjuagues bucales después de la extracción de dientes.

En Surinam usan la corteza contra fiebres y parásitos. También es considerada como tónico, estomático y aperitivo, recomendada para la diarrea, disentería, dispepsia, blenorragia, gas intestinal, dolores de estómago, anemia y desórdenes gastrointestinales. Es además laxante, amebicida y antihelmíntico. Es un excelente remedio en condiciones dispépticas, para estimular la producción de saliva y jugos gástricos y para aumentar el apetito. Es un remedio popular contra carcinoma, debilidad, dispepsia, fiebre, hepatitis, hiperglicemia, malaria, mordidas de serpientes y espasmos. También tiene propiedades antileucémicas y antitumorales.

Esta especie ha sido usada también para la diabetes Mellitus (Holdridge y Poveda, 1975), problemas hepáticos, antiglicémico y antipirético. Es utilizada para regular la presión sanguínea y contra la diabetes.

2.1.5.2. Insecticida

Debido a la presencia de los principios activos cuasina y neocuasina, la cuasia puede ser utilizada como insecticida natural (Brown, 1995). Estos principios activos tienen efecto insecticida sobre varias especies de homópteros, lepidópteros y coleópteros (Grainge y Ahmed, 1988). En Nicaragua se considera a *Q. amara* como una especie de mucho interés económico por sus propiedades como insecticida natural (Villalobos y Ocampo, 1997).

La efectividad insecticida de *Q. amara* fue demostrada en el control de áfidos. El extracto acuoso de la madera actúa como veneno de contacto contra *Aphis dabrae*, *Bombix mori*, *Chaitophorus populicola*, *Hoplocampa flava*, *Macrosiphum ambrosiae* y otros (Grainge y Ahmed, 1988). En otras regiones, además de su uso como base de insecticidas agrícolas, se ha empleado en trampas domésticas de moscas. Loaiza *et al.* (1996), utilizaron su extracto, principalmente contra *Bemisia tabaci* (mosca blanca), con lo que causaron mortalidad de los adultos. Similarmente Cubillo *et al.* (1997), en la búsqueda de principios activos en plantas silvestres, obtuvieron que con los tratamientos con el extracto acuoso de su corteza se lograba la muerte de adultos de *B. Tabaci*. Mancebo (1998) utilizó el extracto de madera y de follaje para estudiar el efecto fagodisuasivo de larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller) y encontró que a concentraciones de 0,32% y 3,16%, las larvas consumían muy poco tejido del hospedero, confirmando su potencial fagodisuasivo.

2.1.5.3. Madera

Los indígenas de Costa Rica comercializan trozos de tallo desde el siglo pasado, debido a la demanda existente para diversos usos, práctica que también es común en otros países. La madera ha sido utilizada para la confección de copas y cajas para la protección de alimentos y de ropa, pues se cree que no es atacada por los insectos por su contenido de cuasinoides que le dan las propiedades amargas (García, 1992; Pérez, 1990).

2.2. CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA

2.2.1. Generalidades

La caracterización de germoplasma consiste en la toma de datos, principalmente cualitativos, que permiten describir y en consecuencia diferenciar accesiones de una misma especie (Querol, 1992). El objetivo principal de la caracterización es describir y dar a conocer el valor del germoplasma. Hay otros objetivos más específicos como la identificación taxonómica correcta, la descripción morfológica, la evaluación de caracteres de valor agronómico, las estimaciones de la variabilidad fenotípica y las relaciones entre características (Sevilla y Holle, 1995).

La recolección de plantas silvestres para la preservación del germoplasma de la mayoría de los cultivos o plantas útiles al hombre, como los cereales, ha sido uno de los esfuerzos más grandes que el hombre ha realizado en los últimos años, especialmente cuando se dio cuenta que algunos problemas del campo no pudieron solucionarse con las colecciones de material mejorado, pues éste durante el proceso de domesticación, selección natural y con mayor razón durante la selección artificial o dirigida con objetivos bien claros, perdió la mayoría de características de rusticidad, tolerancia o resistencia a las enfermedades, amplia adaptación, etc. (Enríquez, 1991).

La caracterización del germoplasma es un proceso que se inicia con la colección o introducción de datos. La sistematización es un pre-requisito para que la información sobre el germoplasma sea útil (Sevilla y Holle, 1995).

2.2.2. Caracterización morfológica

La mayoría de las plantas con importancia económica, tienen sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Para llegar a estos protocolos se ha realizado estudios básicos de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los

caracteres dentro y entre plantas; luego se han evaluado aquellas características cualitativas o cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (Enríquez, 1966).

Teóricamente el número de datos que se pueden tomar durante la caracterización y la evaluación es infinito, pero una buena descripción de las plantas no está determinada por el número de variables descritas sino por la utilidad práctica de éstas y su precisión (Querol, 1992). En la práctica, la toma de datos se limita a características de importancia para el mejoramiento o para la utilización de la planta, que sean de utilidad para conocer la estructura poblacional de la especie (Querol, 1992).

Es importante también estimar el tamaño óptimo de la muestra, es decir, el número de observaciones que se deben hacer dentro de una planta o de plantas del mismo clon o cultivar para que el parámetro represente la muestra del clon estudiado (Enríquez, 1966).

Los marcadores morfológicos - cuantitativos se consideran como el resultado de los efectos combinados de muchos genes y el ambiente, por ejemplo altura de la planta, número de pétalos, longitud de la mazorca. Para su evaluación se requiere de una medida, conteo o calificación (Martínez, 1995). Los caracteres morfológicos han sido muy usados para la identificación de especies, familias y géneros de plantas. Además, las características y su etnobotánica han sido el tema de numerosos estudios en genética de poblaciones y agricultura, donde la resistencia a plagas y enfermedades y el rendimiento han sido factores importantes (Falconer, 1981).

Los tipos de caracteres utilizados para caracterizar la diversidad genética son numerosos. Tradicionalmente se ha utilizado las variaciones morfológica relacionadas especialmente con el hábito de crecimiento, tamaño, forma y color de la semilla. Esta variación es mayor en las formas cultivadas que en las formas silvestres (Chicaiza, 1991).

En la mayoría de las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente. Quizá los órganos más importantes son la flor y el fruto; les siguen en importancia, las hojas, tronco,

ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enriquez, 1991).

Los términos más usados en caracterización sistemática son el descriptor y el estado del descriptor. El primero es un atributo o característica observable en las introducciones de un banco de germoplasma (Querol, 1992). Los estados del descriptor son los valores que puede tener un descriptor en un caso específico.

Los descriptores permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente son caracteres altamente heredables, pueden ser detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes (IBPGRI, 1995).

Los descriptores muestran variaciones continuas, y en ocasiones son usados en un sistema natural de clasificación, aún cuando el ambiente o la relación genotipo-ambiente esté afectando significativamente la expresión fenotípica (Sevilla y Holle, 1995).

El uso de los descriptores propicia un lenguaje común de la información y fomenta el intercambio más eficiente tanto de la información como del material genético (Rincón, 1991).

Según Goodman y Paterniani (1969), existen tres vías para disminuir el efecto del ambiente y la interacción fenotipo-ambiente que son: a) el acceso al germoplasma en ambientes controlados y usando valores medios; b) evaluación del germoplasma en ambientes controlados y definiendo la respuesta de fenotipos similares en cada ambiente específico; c) comparando solamente aquellos rasgos que no son afectados por el ambiente.

Las especies vegetales cuya calidad de producto es dependiente de la síntesis de metabolitos secundarios, y no solamente de la producción de biomasa, requieren de la definición de las condiciones más favorables para ambos procesos. En el caso de cuasia, los resultados de las investigaciones muestran marcadas diferencias entre grupos de poblaciones y localidades; en cuanto a la abundancia de regeneración dependiendo del

ambiente y tipo de bosque (Ling, 1995), y a nivel de calidad las pruebas biológicas indican diferencias de contenidos de principios activos entre partes de un mismo individuo que se desarrollaron bajo diferentes condiciones de luz (Cáceres *et al.* 1995).

Estas diferencias y preferencias de ambiente dentro del bosque, permiten suponer que es posible tener varias calidades de materia prima, así como se puede seleccionar sitios favorables al crecimiento con fines de aprovechamiento.

En la caracterización morfológica de *Q. amara* en poblaciones silvestres de Centroamérica realizada por Upegui (1998), determinó que características cuantitativas como longitud y ancho de la hoja, así como longitud del foliolo permitían diferenciar poblaciones de esta especie.

2.2.3. Caracterización molecular

Las variables, los caracteres o parámetros, que se han utilizado para observar y detectar la variabilidad presente en los seres vivos, son numerosas. Los marcadores genéticos son una clase de éstos y, con ellos, se espera que reflejen la variabilidad existente entre los individuos o poblaciones de estudio.

La información genética de las plantas superiores se encuentra almacenada en la secuencia del ADN de los cromosomas nucleares y los genomas de los organelos. Las plantas son capaces de replicar su ADN con mucha rapidez y exactitud, pero durante este proceso pueden ocurrir cambios en el ADN como resultado de inversiones, translocaciones, deleciones y transposiciones, además de mutaciones (cambio de 1 ó 2 nucleótidos). Debido a la gran cantidad de ADN presente en las células de las plantas superiores, es casi imposible encontrar dos organismos con una misma secuencia de ADN (Chicaiza, 1991).

Las técnicas de biología molecular y particularmente, el uso de los marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés. En cuanto

a los recursos genéticos, los marcadores moleculares han aportado información relevante en áreas clave de la conservación *in situ* y *ex situ* (Karp *et al.* 1997).

En los últimos años se han desarrollado las estrategias generales para la detección de polimorfismos moleculares como hibridación molecular, amplificación enzimática y secuenciación de ADN. Un ejemplo de esto es la introducción de la reacción en cadena de la polimerasa (Saiki *et al.* 1988), un método *in vitro* de amplificación enzimática de segmentos específicos de ADN (Otero, 1997).

Un marcador molecular es definido por Walton (1993) como cualquier característica química o molecular medible que es heredada según un modelo mendeliano simple. Para Caetano-Anolles (1993), los marcadores moleculares son una serie de métodos de análisis genético-moleculares que se basan en la detección de polimorfismos en proteínas y ADN cuyos principios y técnicas se han utilizado para resolver problemas específicos en genética y ecología de poblaciones, evolución de sistemas reproductivos, mapeo genético de caracteres de interés agronómico, procesos de hibridación e introgresión, determinación de patrones biogeográficos, resolución e identificación de relaciones taxonómicas, reconstrucción de filogenias y biología de la conservación (Otero, 1997).

Las principales técnicas moleculares para la caracterización molecular son:

- Las que analizan indirectamente el ADN a través de sus productos como las isoenzimas y las proteínas.
- Las que analizan directamente el ADN como los RFLP, PCR, RAPD, AFLP y SSR (microsatélites).

La selección del tipo de marcador a usar depende de los objetivos del estudio, de la especie de interés, de la disponibilidad de recursos técnicos y financieros con que se cuente.

Las ventajas de la caracterización del ADN son: a) no es influenciada por el medio-ambiente; b) cualquier parte de la planta puede ser utilizada y en cualquier estado de crecimiento; excepto para isozimas c) el análisis es ilimitado; d) se requiere de pequeñas cantidades de tejido; e) el ADN es altamente estable; f) se detecta alto polimorfismo; y g) están distribuidos en todo el genoma (Powell, 1992; Rao y Riley, 1994).

Con los marcadores moleculares es posible desarrollar trabajos de conservación genética y poblaciones mejoradas, evitando los obstáculos que se encuentran en los ensayos cuantitativos, como los efectos ambientales, dificultades para calcular parámetros de diversidad genética, y la necesidad de varios años de crecimiento antes de que muchas pruebas sean evaluadas. Los marcadores genéticos o moleculares pueden ser probados al azar sobre una amplia variedad de genes funcionales, y la variación genética es medida por el porcentaje de loci donde existen polimorfismos, y se espera que exista heterocigocidad bajo el equilibrio de Hardey-Weinberg (Loveless, 1992).

El análisis de marcadores moleculares es una herramienta importante en la caracterización de recursos genéticos. Muchas técnicas son desarrolladas para un análisis rápido y eficiente de números grandes de muestras. El análisis por marcadores moleculares tiene un papel importante, particularmente en el desarrollo de "*core collections*" y monitoreo de cambios genéticos durante el mantenimiento de colecciones de recursos genéticos vegetales (Andersen y Fairbanks, 1990).

El paso inicial para utilizar las técnicas de marcadores moleculares es contar con cantidades adecuadas de ADN. Para el caso específico de *Q. amara*, Upegui (1998) encontró que el método de extracción de ADN CTAB-minipreparaciones modificado de Doyle y Doyle (1987) fue el más eficiente en una evaluación con diferentes genotipos. Obtuvo entre 30 y 150 ng de ADN/ μ l, partiendo de 0,2 g de hojas frescas o congeladas. Encontró que es más eficiente la extracción a partir de hojas jóvenes que de hojas intermedias o adultas.

2.2.3.1. Análisis PCR /RAPDs

La Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) es un procedimiento de amplificación enzimática de un segmento específico de ADN (Mullis y Faloona, 1987; Sambrook, *et al.* 1989). La capacidad de PCR de amplificar secuencias específicas de nucleótidos millones de veces, facilita el uso de ciertas tecnologías para el análisis del ADN. La amplificación con PCR involucra el uso de dos primers oligonucleótidos y ciclos repetidos de calor de desnaturalización del ADN (Powell, 1992).

El análisis RAPD o "Random Amplified Polymorphic DNA (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) fue descrito por primera vez en 1990, en forma independiente por Welsh y McClelland (1990) y Williams *et al.* (1990).

RAPD (Williams *et al.* 1990) es una modificación de la técnica PCR. La modificación que dio origen a los RAPDs consistió en sustituir en la metodología PCR el uso de un par de "primers" cuidadosamente diseñados y largos, por un solo "primer" corto y por lo tanto con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes (Waugh y Powell, 1992).

La técnica PCR-RAPD es de gran utilidad en la obtención de "fingerprintings" genómicos de individuos, variedades y poblaciones; en el análisis de estructuras y diversidad genética en poblaciones naturales y para establecer relaciones filogenéticas, para determinar el nivel de variabilidad dentro de géneros, caracterizar clones y para construir mapas de ligamiento genético (Phillips-Mora *et al.* 1995) también constituyen un eficiente ensayo para polimorfismos, los cuales permiten una rápida identificación y aislamiento de fragmentos de ADN específicos del cromosoma. Los polimorfismos producidos con esta técnica se denominan marcadores RAPD. (Williams *et al.* 1990).

Como una consecuencia directa de la reacción en cadena de la polimerasa, el análisis de ADN se vuelve accesible a muchos investigadores. Este método no requiere previo conocimiento de la secuencia de ADN para generar marcadores genéticos. Debido a la

facilidad de obtener datos RAPD, el método ha sido empleado en cientos de estudios (Wolfe y Liston, 1997).

Al igual que los RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), la técnica RAPD puede generar un número inmenso de marcadores, pero a diferencia de aquella no requiere del desarrollo de sondas específicas para cada especie ni tampoco del uso de sustancias radioactivas.

Comparado con los SSRs (microsatélites), no se requiere trabajo previo para elaborar los "primers" o iniciadores, no requiere de personal especializado. Comparado con AFLP, no se utiliza poliacrilamida para la elaboración de geles, la cual es una sustancia muy tóxica.

El problema principal de los RAPDs es su falta de repetitividad entre laboratorios. Otra desventaja es que es un marcador dominante. También se informa de desviaciones de lo esperado según la herencia Mendeliana (esto puede ser causado por variación no genética y por los artefactos usados); así como problemas en evaluación de las homologías (Wolfe y Liston, 1997).

2.2.3.2. Descripción de la metodología RAPD

La técnica RAPDs consiste en el uso de un oligonucleótido corto de secuencia arbitraria para cebar (iniciar) la amplificación de fragmentos de ADN por medio de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): un oligonucleótido puede cebar la amplificación a partir de un molde genómico uniéndose a sitios específicos en las hebras opuestas del molde. Si existen diferencias en una o ambas hebras donde deben insertarse los cebadores (iniciadores), se da como resultado la no amplificación de la banda (Wolfe y Liston, 1997; Haines y Martin, 1995, Phillips-Mora *et al.* 1995).

Para realizar el análisis RAPD se requiere de cinco elementos básicos (Williams *et al.* 1990; Lowe *et al.* 1996):

- a. **ADN molde:** Se obtiene mediante diversas metodologías que están disponibles. El método de extracción del ADN no es tan importante, aunque su vida depende de la técnica de extracción y de las condiciones de almacenamiento (Sambrook *et al.* 1989; Weising *et al.* 1995). Las técnicas basadas en PCR no requieren preparaciones puras de ADN (Edwards, *et al.* 1991) de manera que se pueden utilizar métodos de extracción relativamente rápidos y simples (Lowe *et al.* 1996). Las concentraciones finales de ADN son importantes, cantidades entre 5 y 500 ng usualmente proveen buenos resultados, los patrones RAPD parecen ser afectados por concentraciones muy bajas de ADN pero concentraciones altas pueden afectar también la repetitividad del bandeo (Munthali, *et al.* 1992). La concentración óptima de ADN sugerida es de 10-50 ng por 50 ml de reacción (Weising *et al.* 1995).

- b. **Iniciador o blanco de la reacción PCR ("primer").** Es un oligonucleótido, un segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos (normalmente 10 en el caso de RAPDs) con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Para la mayoría de las plantas los "primers" pueden generar de 2-10 productos de amplificación.

- c. **Desoxinucleótidos:** se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.

- d. **Solución tampón ("Buffer"):** Debe contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada generalmente a un pH de 8.4.

- e. **Taq-polimerasa:** es una enzima ADN – polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus*. Esta enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado por el "primer" o iniciador.

Durante el análisis RAPD se dan una serie de reacciones químicas repetidas en forma cíclica, cuya constitución relativa al proceso global varía entre los ciclos iniciales, medios y

finales (Ruano *et al.* 1991). Cada ciclo está compuesto de tres fases que son definidas por cambios en la temperatura, así:

- a. La desnaturalización del ADN o de los productos previamente sintetizados mediante la incubación a altas temperaturas (94°), seguidamente, las dos cadenas se separan y permanecen libres en solución hasta que la temperatura se reduce.
- b. Cuando la temperatura se reduce (36°), ocurre la unión del "primer" a sitios complementarios de la cadena disociada.
- c. La síntesis en una dirección específica (de 5' a 3') y a partir del sitio de unión del "primer", de la doble cadena mediante la acción de la polimerasa y la presencia en la solución de desoxinucleótidos libres y otros elementos minerales esenciales como el magnesio y el potasio. Esta fase se produce a temperaturas óptimas para la taq polimerasa, o sea 72°C.

La repetición sucesiva de los tres pasos anteriores permite obtener fragmentos amplificados a razón de microgramos, después de haber iniciado el proceso con cantidades muy pequeñas de ADN.

Los fragmentos pueden ser fácilmente visualizados, realizando una electroforesis en gel de agarosa y tiñendo los fragmentos con bromuro de etidio (Williams *et al.* 1990). Este colorante se intercala en la cadena de ADN y produce una fluorescencia anaranjada al ser expuesta a luz de 320 nm.

La eficiencia de la técnica de RAPD depende de los siguientes factores:

- a. **Número de ciclos de amplificación:** se debe tener en cuenta que en los primeros ciclos el producto se incrementa más rápidamente que en los ciclos finales.

- b. **Cantidad de ADN inicial:** las muestras con concentraciones relativamente altas de ADN producen rendimientos más bajos de amplificación que las reacciones en que se usan bajas concentraciones.
- c. **Longitud del ADN:** la eficiencia es inversamente proporcional a la longitud del ADN.
- d. **Temperatura:** el proceso está regulado por este factor.
- e. **Calidad de la Taq:** con las diferentes Taq es posible obtener separación de fragmentos de diferente peso molecular.

Los ejemplos en la literatura en que se ha utilizado RAPDs, son abundantes y se han dado en plantas tanto de clima templado como tropical. A continuación se presentan algunos de ellos.

La técnica RAPD fue utilizada para estudiar relaciones genéticas entre 9 procedencias europeas de abeto (*Picea abies*). Estas fueron separadas en dos grupos: uno de procedencia Nórdica y la otra Alpina (Scheepers, *et al.* 1997). En otro estudio sobre la identificación de clones de otra especie de abeto (*Picea sitchensis*) en Gran Bretaña, se encontró que los marcadores RAPDs fueron útiles para detectar la variabilidad y la identificación de clones del abeto Sitka. Se identificaron 57 clones utilizando 6 primers y un mínimo de 4 fue requerido para distinguir todos los clones. La variación dentro de clones pareció ser más alta que la variabilidad dentro de poblaciones naturales (Van de Ven y McNicol, 1995).

En un estudio comparativo de la diversidad genética de tres grupos principales de cacao (*Theobroma cacao*) se encontró que características morfológicas y secuencias RAPD separaron los materiales en dos grupos, el grupo Criollo y el Forastero; el tercer grupo era el Trinitario, que representan híbridos de los dos anteriores (N'Goran, *et al.* 1994).

Para realizar la caracterización morfoagronómica y molecular de la colección de jícama (*Pachirrizus tuberosus*) del CATIE, se utilizó la técnica RAPDs. Esta técnica permitió clasificar los genotipos en tres grupos genéticos y detectar posibles duplicados y errores de etiquetado de las introducciones en la colección, así como definir la ubicación correcta de

los materiales. Se encontró correlación entre la caracterización morfoagronómica y la molecular (Tapia, 1998).

También en CATIE se estudió la diversidad genética de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King) de Centroamérica y México, utilizando marcadores RAPDs y variables cuantitativas (Vásquez, 1998). Las procedencias estudiadas se asociaron en dos grupos básicos, uno conformado por las familias de Panamá y el otro por el resto de las procedencias de Centroamérica y México, lo que sugiere que ambos grupos tienen un origen y/o evolución diferente. Los genotipos de Costa Rica formaron también un grupo que se separó del resto de Centroamérica. El estudio cuantitativo mostró la existencia de una alta variabilidad genética dentro y entre procedencias. Las variables largo de raíz y la relación "materia seca aérea/materia seca de raíz" mostraron índices bajos de heredabilidad, en tanto que para las otras variables fueron moderados.

2.3. RELACIÓN ENTRE LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR

La diversidad genética de un cultivo se puede estudiar por medio de técnicas moleculares y también por los rasgos morfológicos. La diversidad molecular no considera las interacciones genotipo por medio ambiente; por lo tanto, estas dos técnicas se complementan una con la otra (Taba, 1991).

La mayoría de los sistemáticos reconocen que los enfoques morfológicos y moleculares tienen cada uno distintas ventajas. La ventaja más grande de los datos moleculares es la extensión de la base de datos, debido a que toda la información heredable de un organismo está codificada en el ADN. La base de datos morfológicos con una base genética es un subconjunto muy reducido de la información molecular. En principio, ni los métodos moleculares ni los morfológicos son limitados por la escala filogenética en su aplicación. En la práctica, caracteres morfológicos son compartidos entre grupos mayores de organismos (eucariotas *versus* bacterias, por ejemplo). Al contrario, las biomoléculas proveen un registro filogenético a partir de un tiempo muy reciente al origen de la vida en

la tierra, debido al tamaño y diversidad en las proporciones de los cambios de diferentes porciones del genoma (Hillis, 1987).

La variación morfológica no puede indicar claramente el nivel de variación genética desde que hay dificultad para distinguir la variación resultante de diferencias en un locus versus muchos loci (Brown, 1978).

Las técnicas de sistemática morfológica y molecular tienen distintas ventajas para la reconstrucción filogenética. Las técnicas morfológicas son aplicables para muchos estudios de material fósil y de museo, y para una gran cantidad de organismos de la tierra que son estudiados principalmente o exclusivamente a partir de información morfológica. Por otro lado, el potencial de una base de datos moleculares es increíblemente extenso y cuando es completamente utilizado, provee un registro detallado de la historia de la vida. Los estudios que combinan estos dos enfoques pueden maximizar el contenido de la información y la utilidad. Es importante seleccionar los métodos de análisis que sean tan libres de conjeturas como sea posible y que sean amigables con la combinación de datos. Esto requiere métodos independientes de construcción de red de trabajo y de árboles arraigados. Las combinaciones de estudios moleculares y morfológicos proveerían una visión verdaderamente comprensiva de la evolución biótica (Hillis, 1987).

Las estimaciones de similitud genética (o distancia) entre poblaciones o especies de plantas pueden basarse en marcadores genéticos bioquímicos o morfológicos, características cuantitativas o análisis de pedigree. Aunque los tres tipos de estimación pueden ser usados para inferir relaciones genéticas, la correspondencia entre ellas es a veces baja y nunca perfecta, principalmente debido a las desviaciones de las muestras y a la falta de fenotipos para diferenciar genotipos precisamente. Estimaciones de similitud genética que requiere datos de pedigree detallados usualmente no se obtienen para poblaciones naturales o para especies de polinización cruzada (Cox, *et al.* 1985).

Existen investigaciones en que se ha correlacionado caracteres morfológicos con moleculares. Autrique *et al.* (1996) obtuvieron una correlación moderada entre RFLPs

basados en distancias genéticas y distancias basadas en caracteres morfológicos en trigo. Schut *et al.* (1997) utilizando RFLP y AFLP en avena encontraron relaciones de baja a moderada entre estos marcadores y los caracteres morfológicos. Tapia (1998), realizó una caracterización molecular de *Pachirrizus tuberosus* y simultáneamente evaluó 70 caracteres morfológicos cualitativos y cuantitativos. Estableció que la mejor relación entre los parámetros se deba entre los resultados moleculares y los caracteres cualitativos.

Para comparar las matrices de datos moleculares y morfológicos, se calculan las distancias genéticas o coeficientes de similitud por cualquier algoritmo, puede ser Jaccard o Nei (Nei, 1973). Los datos morfológicos deben ser estandarizados para cada característica y ejecutar una transformación de rangos o un análisis de componentes. Una vez obtenidas las matrices de ambos tipos de caracteres se comparan con el comando MXCOMP el software NTSYS-pc o mediante el estadístico Mantel. También puede ser usando el procedimiento bootstrap (Efron y Tibshirani, 1993).

2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2.4.1. Tamaño de la muestra

Un método de muestreo que permita recolectar la máxima variabilidad genética con el menor número de muestras, requiere de información cuantitativa sobre la distribución de la variabilidad entre las poblaciones de una especie o entre los individuos de una misma población (Okada, 1991).

Para definir los mejores caracteres para evaluar determinados genotipos, se debe estimar el número de observaciones que se deben hacer de una planta o de una población. Para esto se deben hacer estudios previos en los que se represente la mayor variabilidad posible de la especie; así se puede garantizar que la muestra no cambie sensiblemente de población a población (Enríquez, 1991).

El tamaño de la muestra para caracterizar depende de la varianza de la población, el nivel de heterocigocidad y las frecuencias alélicas de loci polimórficos. La varianza de la población generalmente es desconocida. Se supone que en poblaciones nativas la varianza es considerable; evidencia de ello es que generalmente la variancia fenotípica es grande (Sevilla y Holle, 1995).

Según Mateucci y Colma (1982), cuanto mayor sea el número de unidades muestrales, más precisa será la estimación de la variable considerada. Sin embargo, dado el costo de muestreo, es necesario llegar a un compromiso, tal que el esfuerzo invertido sea equivalente a la cantidad y a la calidad de la información recuperada.

2.4.2. Análisis de conglomerados.

Una muestra por conglomerados es una muestra aleatoria en la cual cada unidad de muestreo es una colección, o conglomerado, de elementos (Scheaffer, *et al.* 1987; Cochran, 1954).

El análisis de conglomerados es una técnica para agrupar "n" individuos en grupos o conglomerados, utilizando mediciones realizadas en "p" variables. Al iniciar un análisis de conglomerados normalmente no sabemos cuantos grupos hay o qué características tiene cada grupo. Normalmente en cada individuo se miden diversas variables, de modo que los datos forman una matriz (Hernández, 1998).

Una muestra por conglomerados en dos etapas se obtiene seleccionando primero una muestra aleatoria de conglomerados y posteriormente una muestra aleatoria de los elementos de cada conglomerado muestreado (Scheaffer, *et al.* 1987).

Scheaffer *et al.* (1987) el problema de la selección de tamaños de muestra es mucho más difícil en el muestreo por conglomerados en dos etapas que en una etapa. Se debe seleccionar los valores para n y todas la m_i , además, la mejor selección de estos valores

depende de dos fuentes de variación, la que existe entre los conglomerados y la que se encuentra entre los elementos dentro de conglomerados. El principio general es asignar los recursos de la muestra a la componente con la variación más grande. Esto es, si las mediciones en los conglomerados son homogéneas, pero las medias de éstos varían grandemente de un conglomerado a otro, se muestran muchos conglomerados con pocas mediciones de cada uno. Sin embargo, si las mediciones en conglomerados varían grandemente, pero las medias de éstos son homogéneas, se muestrean pocos conglomerados y muchas mediciones de cada uno.

El agrupamiento se hace con base a una medida de distancia o disimilitud, o equivalentemente, con base a una medida de similitud. Estas técnicas son descriptivas y no requieren supuestos en cuanto a distribución estadística, número de grupos real, o estructura de grupos en la población (Hernández, 1998).

2.4.3. Valor discriminante de los caracteres

Convencionalmente, el término "discriminación" (introducido por R.A. Fisher) se refiere a técnicas estadísticas que tratan de determinar en qué grado las características asociadas a varios objetos o individuos permiten decidir si pertenecen a uno de varios grupos conocidos. Para lograr este propósito, el análisis discriminante utiliza datos de ciertas variables medidas u observadas en cada objeto o individuo y construye a partir de ellas nuevas variables llamadas "discriminantes" que permiten separar lo más que se pueda a los grupos conocidos de antemano (Hernández, 1998).

Los objetivos del análisis discriminante pueden ser descriptivos o decisionales. Los descriptivos se persiguen cuando se desea una representación del conjunto de observaciones que permita verificar si se está en presencia de grupos bien diferenciados, cuando se pretende encontrar la variable o conjunto de variables que mejor discriminan a los grupos preestablecidos de observaciones. Los decisionales se persiguen cuando se trata de reclasificar ciertas observaciones del conjunto inicial I y cuando se tiene por finalidad

clasificar nuevas observaciones (observaciones que no estaban presentes en el conjunto I inicial) en uno de los grupos existentes (Judez, 1989).

El valor discriminante o índice "D" de un descriptor cuantitativo, es el número de diferencias significativas detectadas por la prueba de Duncan, expresadas como una fracción del número total de posibles comparaciones dentro de un grupo de clones. La comparación permitirá seleccionar los descriptores con mayor valor discriminante. El valor índice "D" para caracteres cualitativos se basa en el número de pares de taxa que un cierto descriptor pueda separar y sobre la cantidad de información que este descriptor comparta con otros descriptores del mismo estudio. La comparación de valores "D" entre un grupo de descriptores permitirá seleccionar aquellos con mayor valor discriminante. En general la magnitud de "D" expresa la mayor o menor relación entre clones de un grupo con relación a un determinado carácter, entre mayor sea la relación de los clones de un grupo, menor será el valor de "D" (Engels, 1983).

2.4.4. Asociación entre variables

El análisis de regresión múltiple (ARM) sirve para medir la relación entre un conjunto de variables predictoras (independientes) y una variable respuesta o dependiente (Hernández, 1998).

El análisis de correlación canónica (ACC) es una extensión natural del análisis de correlación múltiple, motivada por la necesidad de estudiar fenómenos que no pueden representarse por una sola variable dependiente. Es decir, al ACC es una técnica para analizar la relación entre dos conjuntos de variables (Hernández, 1998).

En general, el ARM determina la combinación lineal de las variables independientes X que mejor explica la variabilidad en la variable dependiente Y; el ACC busca en primer lugar, dos combinaciones lineales o sumas ponderadas llamadas variables canónicas: una formada con las "p" variables dependientes y otra con las "m" variables independientes,

tales que la correlación lineal entre ellas (llamada correlación canónica) sea lo más grande posible (Hernández, 1998).

Según el mismo autor, el ACC continúa extrayendo hasta un máximo de M pares de variables canónicas y correlaciones, donde $M = \min(p, m)$. Los pares de variables canónicas se construyen de manera que ninguna de ellas esté correlacionada con ninguna de las variables canónicas de los otros pares canónicos y, además, las variables canónicas de cada par tengan correlación máxima entre sí.

Según Hohenboken (1985), la correlación fenotípica (r_f) entre dos caracteres es la extensión a la cual los individuos que están por encima del promedio de un carácter tiende a estar por encima, debajo o cercano al promedio del otro carácter, y la correlación genética (r_g) es una medida de la magnitud a la cual los mismos genes o genes estrechamente ligados causan variación simultánea en dos caracteres diferentes.

Las relaciones genéticas entre individuos y poblaciones pueden ser medidas por similitud por algún número de caracteres cuantitativos, donde los caracteres son parámetros agronómicos de la planta tales como duración del estado de crecimiento, producción de granos o tamaño de inflorescencia. Esto asume que las diferencias entre los caracteres de los genotipos reflejan la diversidad genética de los genotipos. Las relaciones genéticas entre un gran número de cultivares puede resumirse usando análisis cluster para ubicar genotipos similares en grupos fenotípicos. El análisis multivariado de caracteres cuantitativos ha sido utilizado previamente para medir relaciones genéticas dentro de especies de cereales como cebada, trigo y arroz (Souza y Sorrells, 1991a).

El análisis cluster puede ser usado para identificar cultivares con adaptación similar, que puede ser útil para muestrear en estudios subsecuentes y selección parental en programas de mejoramiento. Para probar estas aplicaciones en avena (*Avena sp*), las relaciones entre 70 cultivares actuales y antiguos de Norteamérica y accesiones de germoplasma de 13 caracteres cuantitativos fueron medidas usando análisis cluster. El cual produjo cuatro

grandes grupos que generalmente correspondieron a la latitud de origen o adaptación con diferencias significativas entre grupos para todos los caracteres (Souza y Sorrells, 1991a).

Souza y Sorrells, (1991b) estudiaron características cualitativas de poblaciones cultivadas de avena (*Avena sativa* y *A. bizantina*) en diferentes épocas del año, determinaron mediante análisis *cluster* que son grupos genéticamente divergentes.

2.4.5. Análisis de datos moleculares

Según Martínez (1995), los métodos y procedimientos estadísticos disponibles para el análisis de los resultados provenientes de ensayos biotecnológicos se pueden agrupar en las siguientes categorías:

1. Aquellos que tienen como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y composición genética de las poblaciones.
2. Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares, y
3. Los denominados QTL (Quantitative Trait Loci), los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia económica, como el rendimiento que proveen al fitomejorador de una herramienta molecular ágil, precisa y oportuna de selección indirecta por los caracteres cuantitativos de interés envueltos en el programa de fitomejoramiento.

En biología molecular los resultados obtenidos con estas nuevas técnicas son un conjunto de bandas coloreadas que deben ser cuantificadas y analizadas estadísticamente para determinar diferencias entre los individuos y/o poblaciones en estudio (Gillies *et al.* 1997).

Según Karp *et al.* (1997), el análisis de relaciones genéticas entre muestras empieza con la construcción de una matriz especificando el carácter-estado de cada marcador para cada muestra. Una muestra usualmente será el ADN de un individuo, pero podría consistir de ADN mezclado a partir de un número de individuos (ej. para representar una accesión o taxón). El estado de los marcadores significa que pueden ser binarios, como es la presencia o ausencia de bandas RAPD o sitios de restricción (como lo revelado por RFLPs y técnicas relacionadas), o de multiestado, como es la posición particular de los nucleótidos (A, T, C o G) en una secuencia de ADN.

Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índice de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez, 1995).

2.4. 5.1. Distancia genética

La distancia genética es una medida que expresa la divergencia entre dos poblaciones, razas o colectas, divergencia atribuible exclusivamente a genes o conjuntos de los mismos. La distancia genética puede estimarse como el número de diferencias dividido entre el total de comparaciones. Esto bajo el supuesto de que hay un gran número de loci marcados aleatoriamente por los RAPDs distribuidos a lo largo del genoma, de tal forma que la proporción de diferencias encontradas para estos loci será una buena medida de las diferencias entre los genomas (Otero, 1997).

2.4. 5.2. Índice de similitud

Los índices o coeficientes de similitud son medidas de semejanza entre individuos y poblaciones, algunos de ellos están relacionados con las distancias, mediante funciones algebraicas. Es decir, bajo ciertas circunstancias, es posible calcular distancias euclidianas a partir de los índices de similitud (Martínez, 1995).

Los índices de similitud de caracteres expresados de forma binaria se conocen como coeficientes de asociación, y sus matrices, como matrices de asociación. Estos coeficientes expresan la concordancia entre cada par de unidades experimentales: unidades de

organización taxonómica (OTU), genotipos, individuos de una población etc. para una serie de caracteres de 2 ó más estados (Cornide y Coto s. f.).

Los indicadores de asociación pueden ser de tres tipos; los más usados en trabajos con marcadores moleculares son los que resaltan la doble presencia y en especial los de Nei y Li (1979) y Jaccard (1908).

2.4. 5.3. Dendogramas

Los dendogramas se construyen a partir de una matriz $p \times p$ de distancias o de coeficientes de similitud. Las $p(p-1)/2$ posibles distancias o similitudes obtenidas de p poblaciones se condensan en el dendograma, lo cual facilita y simplifica las inferencias de semejanza o disimilitud entre los diferentes grupos y subgrupos de poblaciones en estudio (Martínez, 1995).

Los dendogramas pueden ser obtenidos mediante métodos de matriz de distancia o cluster análisis. Las distancias entre OTUs están basadas sobre la total similitud entre pares de OTUs. También se pueden utilizar métodos de parsimonia y el objetivo es proveer patrones filogenéticos. Aquí un criterio específico es definido por comparaciones alternativas filogenéticas. Se usan algoritmos específicos para computar los árboles que están en máxima concordancia con este criterio (Tapia, 1998).

Otra manera es con un método de máxima probabilidad usando métodos estadísticos estandares para un modelo probabilístico de evolución. Con este método todos los posibles árboles han de ser evaluados, lo que significa que todo el conjunto de datos debe ser manejado (Weising, *et al.* 1995)

2.4. 5.4. *Bootstrap*

Los datos obtenidos a partir de análisis moleculares, como secuencias de ADN o patrones de bandas (*fingerprints*), son usados como base para clasificar individuos en una población o para hacer inferencias evolutivas o filogenéticas. Los dendogramas son construidos con base en los grados de similitud entre individuos. Los límites de confianza para las agrupaciones producidas mediante dendogramas, sin embargo, no son generalmente fáciles para computar procedimientos estadísticos usuales (Yap y Nelson, 1996).

El método de Felsenstein (1985) consiste en el muestreo repetido con reemplazo de los caracteres en una matriz de OTUs (unidades taxonómicas operativas) X caracteres, para crear numerosas matrices bootstrap del mismo tamaño como la matriz original.

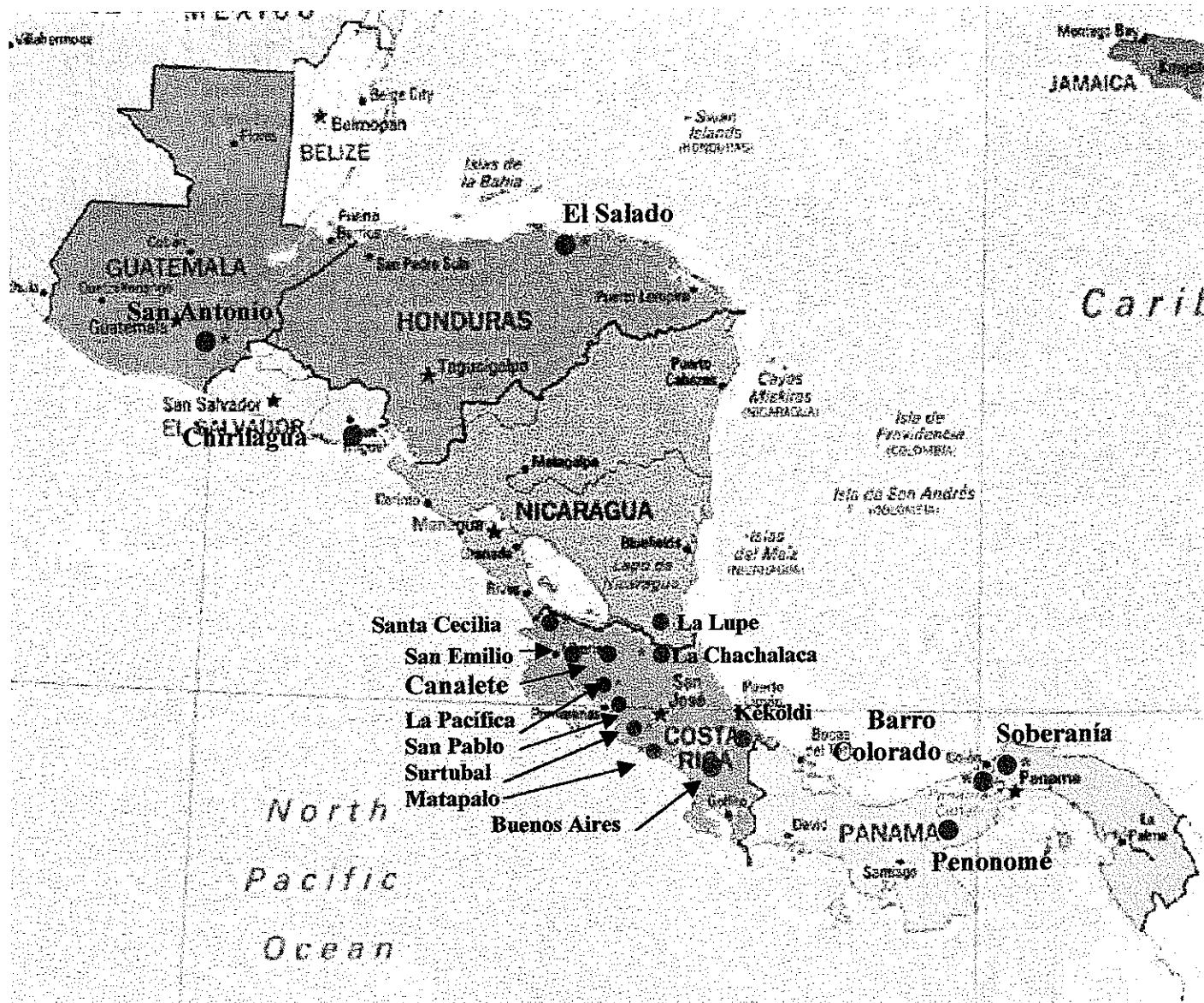
La frecuencia con la cual un grupo particular aparece entre todos los dendogramas construidos proveen una indicación del grado de fuerza para ese grupo (Felsenstein, 1985).

3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación se desarrolló en dos fases. La primera, denominada fase de campo, consistió en la caracterización morfológica de plantas de *Quassia amara* pertenecientes a poblaciones silvestres de Centroamérica. La segunda fase, denominada de laboratorio, se desarrolló en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del CATIE, Turrialba, Costa Rica. Aquí se analizaron hojas de las mismas plantas estudiadas en el campo, utilizando marcadores moleculares RAPD.

Los sitios de colecta se identificaron con base en literatura donde se describe la ubicación de algunas poblaciones silvestres de *Q. amara* en Centroamérica (Villalobos, 1995; Brown, 1995; Upegui, 1998). También se consideró la experiencia previa del Proyecto del CATIE "Conservación para el desarrollo sostenible de América Central, Olafo", e información suministrada por los lugareños en las áreas visitadas. Este fue el caso de Buenos Aires de Osa en Costa Rica, Penonomé en Panamá y Chirilagua en El Salvador.

Se colectaron muestras de 17 sitios en diferentes países: Guatemala, Honduras, El Salvador, Costa Rica y Panamá, en los sitios indicados en la Figura 1 y el Cuadro 1.



*: sitios muestreados para la caracterización morfológica

FIGURA 1. Ubicación geográfica de los sitios de muestreo para la caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara*.

CUADRO 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta para la caracterización morfológica y molecular de las poblaciones silvestres de *Q. amara* en Centroamérica.

Pais	Dpto o Provincia	Municipio o Cantón	Caserío o Lugar	Altitud (msnm)	Longitud	Latitud
Guatemala	Santa Rosa	San Juan Tecuaco	San Antonio	650	90°15'	14°8'
Honduras	Colón	Limón	El Salado	60-90	85°45'	15°45'
Nicaragua	Río San Juan	El Castillo	La Lupe	-	84°25'50"	11°07'30"
Costa Rica	Limón	Baja Talamanca	Kékoldi	160-200	82°49'	09°38'
Costa Rica	Guanacaste	Cañas	La Pacifica	80	85°07'	10°28'
Costa Rica	Alajuela	San Carlos	La Chachalaca	130	84°13'20"	10°47'10"
Costa Rica	Puntarenas	Aguirre	Matapalo	50	83°54'33"	9°18'6"
Costa Rica	Guanacaste	La Cruz	Santa Cecilia	310	85°27'	11°02'
Costa Rica	San José	Turrubares	Surtubal	180	84°31'	9°48'
Costa Rica	San José	Turrubares	San Pablo	-	84°	11°
Costa Rica	Alajuela	Los Chiles	San Emilio	50	84°46'	10°59'
Costa Rica	Alajuela	Upala	Canalete	80	85°03'	10°50'
Costa Rica	Puntarenas	Osa	Buenos Aires	-	83°25'	9°10'
Panamá	Coclé	Penonomé	Penonomé	350	80°20'	8°30'
Panamá	Panamá	Panamá	Parque Soberanía	130	79°40'	9°5'
Panamá	Panamá	Panamá	Barro Colorado	200	79°51'	09°09'
El Salvador	San Miguel	Chirilagua	Chirilagua	470	88°03'	13°17'

3.1. FASE DE CAMPO

3.1.2. Material experimental

El material experimental para el estudio morfológico se obtuvo a partir de arbustos silvestres de *Q. amara*, a los cuales se les colectó hojas adultas, así como flores, frutos y semillas, cuando hubo disponibilidad de ellos. Para los estudios moleculares se colectó a partir de los mismos arbustos, hojas jóvenes y de edad intermedia, lo cual se describirá en la sección respectiva.

3.1.3. Colecta del material experimental

Según la cantidad de arbustos presentes en el sitio, se utilizaron tres sistemas diferentes de colecta:

- a) **Población grande con más de 50 arbustos silvestres:** este fue el caso de Kéköldi, La Chachalaca, La Pacífica, Matapalo, Santa Cecilia, Barro Colorado, El Salado, San Antonio Cabrera y Chirilagua. Aquí se hizo el muestreo por conglomerados (Upegui, 1998) que consistió en seleccionar cuatro puntos muestrales con tres arbustos cada uno. Al llegar a cada punto muestral se trazó un rumbo al azar para seleccionar el segundo y el tercer arbusto, en total doce arbustos por sitio. En todos los casos, las plantas muestreadas debían tener un tronco con 5 cm de diámetro como mínimo.
- b) **Población constituida por menos de 50 arbustos silvestres:** este fue el caso del parque Soberanía y Penonomé en Panamá y Surtubal de Turrubares en Costa Rica. Aquí no fue posible realizar la técnica de muestreo planteada anteriormente. Se buscaron los arbustos que cumplieran con las características deseadas y que fueran representativos de toda el área.
- c) **Sitios con menos de 10 arbustos:** este fue el caso de Buenos Aires (Costa Rica). En este sitio, solamente se encontró una planta muy joven proveniente de las

cercanías del río Volcán. Se colectó hojas jóvenes de esta planta por ser un ejemplar que representaría la población de la zona Sur de Costa Rica.

3.1.4. Datos de pasaporte

En cada sitio visitado se tomó la siguiente información general:

I. Ubicación del sitio de colecta

- I.1. País
- I.2. Provincia o departamento
- I.3. Cantón o municipio
- I.4. Distrito
- I.5. Pueblo o Ciudad más cercana
- I.6. Distancia al pueblo o ciudad más cercana
- I.7. Sitio exacto
- I.8. Longitud
- I.9. Latitud.

II. Condiciones ambientales

- II.1. Precipitación media anual (mm)
- II.2. Temperatura media anual (°C)
- II.3. Topografía: a) plana, b) ondulada, c) quebrada, d) colinada, e) fuertemente socavada, f) montañosa, g) otra.
- II.4. Vegetación predominante: a) bosque, b) bosque secundario, c) tacotal, d) cacao abandonado, e) cacao, f) huerto, g) potrero, h) otro.
- II.5. Descripción general del sitio (Tamaño, densidad de plantas, nivel de sombrío, etc.)
- II.6. Aspectos fenológicos de los arbustos:
- II.7. Presencia de floración
- II.8. Presencia de fructificación

3.1.5. Selección de los descriptores morfológicos

Como paso previo se determinó cuáles de las características morfológicas de hojas, flores, frutos y semillas de *Q. amara*, podrían ser utilizadas como descriptores. Para esto se elaboró una lista de posibles descriptores basada en la observación de materiales de plantas con diferente procedencia, así también, con base en la literatura disponible (Villalobos, 1995; Brown, 1995; Upegui, 1998). Se puso énfasis en los parámetros de hojas, porque a diferencia de los otros órganos, las hojas siempre están presentes en las plantas silvestres. Por el contrario, las flores, frutos y semillas tienen un comportamiento estacional.

El procedimiento seguido para determinar cuáles descriptores evaluar fue el siguiente: se colectó hojas, flores y frutos, se hizo una observación general de estos órganos para detectar algunas características que podrían presentar variación entre individuos y entre poblaciones. Se elaboró el listado de los descriptores y varios modelos de cuadro de recolección de datos, hasta obtener uno que permitió coleccionar los datos y su posterior procesamiento. De las observaciones preliminares y comparaciones entre los descriptores evaluados en las poblaciones de Kéköldi y San Antonio, se decidió no seguir evaluando algunos de ellos, porque las mediciones eran muy variables o no presentaban variación.

Los materiales utilizados para la toma de datos fueron: cinta métrica, brújula, altímetro, clinómetro, vernier, vara para cortar hojas y/o ramas, prensa de herbario, regla graduada, transportador (para medir ángulos), etiquetas, lápiz, tabla de colores de Munsell y cuaderno de apuntes.

3.1.6. Evaluación de los descriptores morfológicos

3.1.6.1. Hojas

De cada planta se seleccionó diez hojas maduras, cada una de ellas con cinco folíolos. En todos los casos, las hojas fueron seleccionadas tratando de que representaran las diferentes partes del arbusto.

En el campo se evaluaron los siguientes descriptores: longitud de la hoja, ancho de la hoja y ángulo de inserción de los foliolos. A diferencia de los otros parámetros, estas variables se evaluaron *in situ*, porque podían sufrir variación si las hojas se transportaban a otro sitio. Luego de su evaluación, el material se envolvió en papel periódico y se colocó en bolsas plásticas debidamente rotuladas, para continuar con la determinación de los otros parámetros en forma posterior. Esto se hizo así, porque la medición de muchas de las variables requería de un tiempo muy prolongado que hacía imposible que dicha evaluación se pudiera completar a nivel de campo.

En el laboratorio se midieron los siguientes descriptores: longitud y ancho del peciolo, longitud y ancho del raquis, longitud y ancho de los foliolos, color del haz y del envés del foliolo terminal, color del punto de inserción del foliolo terminal, ancho de la base y longitud del ápice del foliolo terminal.

A partir de algunos parámetros de hoja, se generaron otros descriptores como fueron la relación "longitud x ancho" y "longitud/ancho" de los diferentes foliolos.

3.1.6.2. Flor

Esta caracterización sólo fue posible realizarla en: San Antonio, Kéköldi, La Pacífica, Matapalo y Chirilagua, que fueron los únicos sitios que tuvieron floración al momento de la visita.

Los parámetros evaluados fueron: longitud del pedicelo, ancho de la base de la corola, longitud y ancho de los pétalos, color de la parte media de los pétalos, cantidad de estambres, longitud de los estambres y longitud del gineceo.

Para la caracterización de la flor, en el arbusto se escogieron cinco inflorescencias al azar, de éstas se tomaron tres flores desarrolladas (abiertas), las de mayor tamaño y que no estuvieran deterioradas. Para la mayoría de los sitios, estos parámetros fueron medidos *in*

situ. En algunas ocasiones fueron medidos en el laboratorio, debido a la falta de tiempo para hacerlo en el campo.

3.1.6.3. Fruto

Esta caracterización sólo fue posible realizarla en los siguientes sitios: San Antonio, El Salado, Kéköldi y Chirilagua .

Se denominó fruto al conjunto formado por el receptáculo con las drupas incrustadas en él. Se consideraron drupas maduras a aquellas que presentaban mesocarpo de consistencia suave y de color amarillo.

Para la caracterización de los frutos, se escogió al azar cinco infrutescencias en el arbusto, de éstas se tomó tres frutos maduros en los que se midió el pedúnculo, la forma de la base del receptáculo, la forma de imbricación de la drupa en el receptáculo y el color del receptáculo. Las evaluaciones fueron realizadas en el sitio de colecta, excepto la longitud y ancho de la drupa central o la más desarrollada, que fueron medidos *ex situ*, en la oficina o en el laboratorio.

3.1.6.4. Semilla

Sólo se encontró semillas en El Salado, Kéköldi y Chirilagua. La caracterización de las semillas se hizo en el laboratorio. Se evaluó un máximo de 15 semillas por planta, para lo cual se seleccionó frutos maduros, con la ayuda de un bisturí, se extrajo el exocarpo y el mesocarpo, hasta obtener la semilla limpia. A continuación se procedió a tomar las medidas antes escritas. En cada caso se midió la longitud, ancho y forma de la semillas.

3.1.7. Elaboración del formulario de evaluación

Con base en la información de pasaporte y en los parámetros de evaluación que debían ser tomados, se elaboró un formulario para simplificar el proceso de toma de información.

3.1.8. Análisis estadístico

En la Figura 2 se presenta el diagrama del proceso de análisis realizado para la caracterización morfológica, a partir de la recolección de los datos.

3.1.8.1. Matriz de similitud, distancia y estructura taxonómica

La estimación de la semejanza entre cada par de individuos se obtuvo mediante el método de coeficientes de distancia, estimado por el Programa SAS versión 6,12 y la distancia de Gower (1967). La fórmula utilizada fue:

$$S_{ij} = \sum s_{ij}/n$$

Donde:

n = número de caracteres cualitativos

S_{ij} = coeficiente de asociación entre dos variables

La estructura taxonómica de las poblaciones se estudió mediante el agrupamiento jerárquico de Ward (1963) con el software SAS versión 6,12.

3.1.8.2. Determinación del valor discriminante

La selección del número de grupos de individuos (agrupamiento) se hizo con base en los criterios de Pseudo F y Pseudo t, mediante el procedimiento CLUSTER del software SAS, versión 6,12.

El valor discriminante para los valores cuantitativos se determinó a través del índice "D" de Engels (1983) utilizando las medias de los grupos en las comparaciones múltiples de Duncan.

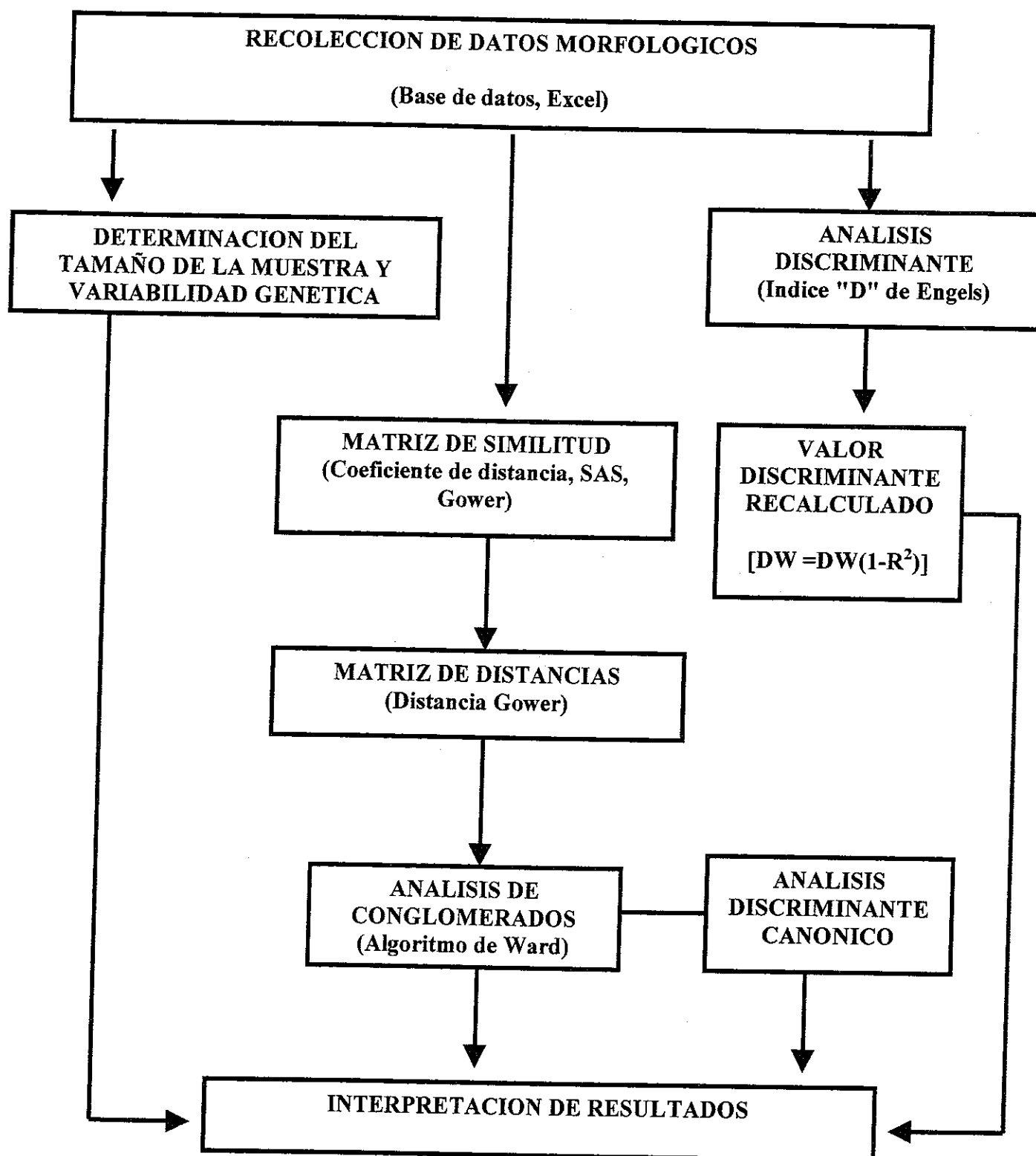


FIGURA 2. Diagrama de flujo para el análisis de datos obtenidos mediante la caracterización morfológica de *Quassia amara*. (Tapia, 1998).

$$D = \frac{\sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=i+1}^k n_i n_j}{N(N-1)/2}$$

Donde :

N = número total de características.

k = número de estados de la característica

n_i = número de individuos que presentan un estado de la característica

n_j = número de individuos que presentan otro estado de la característica.

Para recalcular los valores de Dw se utilizó la fórmula siguiente (Engels, 1983):

$$D'w = Dw (1 - r^2)$$

Donde:

D'w = promedio de los D (valor discriminante) correspondientes a cada grupo

r^2 = coeficiente de correlación al cuadrado entre el carácter en estudio y el más discriminante.

El valor discriminante para caracteres cualitativos se estimó con base en el análisis de frecuencias y las estadísticas de Cramer (V), coeficiente de Contingencia (P) (Fienberg, 1977) y Chi cuadrado (λ^2) (Cochran, 1954), obtenido con el paquete SAS, versión 6,12.

3.1.8.3. Tamaño de muestra

Con base en los descriptores definidos y los datos obtenidos en esta investigación, se determinó el tamaño de muestra para número de plantas por sitio, para cada descriptor de cada órgano evaluado.

Partiendo de la variable cuantitativa más discriminante (Longitud de la hoja) para la separación de grupos obtenido del análisis discriminante, se utilizó la fórmula de Scheaffer *et al.* (1987) para determinar el número adecuado de hojas por planta (m) y el número de plantas por sitio (n). Para esto se utilizó la siguiente fórmula para selección de tamaño de muestra para conglomerado en dos etapas (Scheaffer, *et al.* 1987):

$$m = \sqrt{\frac{\sigma_w^2}{\sigma_b^2}}$$

Donde:

- m : número de hojas por planta
- σ_w^2 : componente de varianza estimada para hojas
- σ_b^2 : componente de varianza estimada entre plantas

Se realizó el análisis de varianza, usando el procedimiento proc GLM de SAS versión 6.12.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	CM	E(CM)
Entre plantas	p-1	CM _b	$\sigma_w^2 + m\sigma_b^2$
Dentro de plantas	P(w-1)	CM _w	σ_w^2
Total	p(w-1)		

$$\sigma_b^2 = \frac{CM_b - CM_w}{M}; \quad \sigma_w^2 = CM_w$$

$$n = \frac{1}{V(\mu)} (\sigma_b^2 + \sigma_w^2/m)$$

Donde:

- n : número de plantas
- $V(\mu)$: varianza a nivel de hojas
- σ_w^2 : varianza estimada dentro de cada planta
- σ_b^2 : varianza estimada entre plantas

3.2. FASE DE LABORATORIO

3.2.1. Material experimental

Para la caracterización molecular se utilizó un arbusto por sitio. Se incluyeron dos testigos que fueron repeticiones de los genotipos de Chirilagua (El Salvador) y del Parque Soberanía (Panamá). Estos testigos consistieron de dos muestras de ADN que fueron aisladas a partir del mismo arbusto, a los cuales se les determinó su concentración de ADN por separado. En el análisis PCR y en los análisis estadísticos fueron consideradas como genotipos diferentes.

1. De cada arbusto se colectó 5-10 hojas jóvenes e intermedias. Las hojas se envolvieron en papel toalla y luego en bolsas plásticas debidamente rotuladas.
2. Los paquetes fueron transportados en un recipiente con hielo, en los casos en que fue posible llevar las muestras al laboratorio en el mismo día que se realizó la colecta. En caso contrario, las hojas fueron mantenidas en un recipiente con hielo durante el tiempo que se necesitó para hacer la colecta, no más de cinco días. En los casos en que no era posible transportarlas ni mantenerlas con hielo, se transportaron secas. Para esto se les colocó 5g de silica gel en la bolsa, evitando que las hojas tuvieran contacto con ella.
3. En el laboratorio, las hojas se organizaron de nuevo, se limpiaron con papel toalla limpio y húmedo y se envolvieron nuevamente en papel y bolsas plásticas rotuladas. Inmediatamente fueron colocadas en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ para su conservación. Algunas hojas fueron almacenadas con silica gel, aquellas que fueron colectadas y no fue posible almacenar inmediatamente en el congelador.

3.2.2. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN.

El aislamiento de ADN se llevó a cabo en todos los casos, utilizando el método CTAB minipreparaciones modificado de Doyle y Doyle (1987), el cual se resume en el Apéndice

1. En este método se partió de una muestra de 0,2 g de hoja que se macera con nitrógeno líquido. La muestra se coloca en un tubo Eppendorf en donde, mediante diferentes sustancias y centrifugaciones, se rompen las estructuras celulares y se eliminan las impurezas hasta obtener un ADN suficientemente limpio.

En algunos casos en que se dificultó la extracción con el método CTAB minipreparaciones, se aplicaron otros procedimientos como el protocolo para cacao usado en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Centro CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza). Esto se hizo para los genotipos de El Salado, Penonomé, Turrubares, usando como testigos un genotipo de cacao y uno de caoba. Además se hizo una prueba de un genotipo de El Salvador, con el método del Xantogenato. Dado que no se obtuvo un resultado satisfactorio, se realizaron nuevas extracciones con el método CTAB-minipreparaciones variando el pH de 7,5, 8,0 y 8,5.

Para cuantificar el ADN se utilizó geles de agarosa (Apéndice 2). En un bloque comparador se colocó 1 μ l de bromofenol (Apéndice 3), más 17 μ l de TE (Apéndice 4) y finalmente se colocó 2 μ l de la solución de madre de ADN. Con una micropipeta de 100 μ l se tomó los 20 μ l de esta solución y se colocó en los pozos del gel de agarosa, en la cámara de electroforesis. Se dejó migrar durante 45 minutos, a 150 voltios, luego el gel fue colocado en la solución de bromuro de etidio para la tinción del ADN. Después de una hora, el gel fue colocado en una bandeja con agua para eliminar el exceso de colorantes, se procedió a la visualización del ADN en la cámara de luz ultravioleta y a tomar la fotografía. En ésta se procedió a leer y a estimar las cantidades extraídas de ADN de cada genotipo, mediante la comparación de las bandas con muestras de concentración conocida.

3.2.3. Procedimiento RAPDs.

Para llevar a cabo la técnica RAPD, se determinó inicialmente para cada genotipo, la concentración de ADN que producía la mejor amplificación. Ésta determinación se hizo mediante pruebas electroforéticas. Para ésto se evaluó diferentes diluciones de ADN hasta llegar a obtener la mejor amplificación. Para la mayoría de los genotipos fue necesario

disminuir las concentraciones de las diluciones de trabajo, hasta una cuarta parte de la concentración inicial. Para los genotipos de La Lupe, La Pacifica, Buenos Aires, Penonomé y Chirilagua se disminuyó diez a quince veces su concentración inicial.

El volumen final de la reacción de PCR fue de 25 μ l, conteniendo las siguientes concentraciones y molaridades: 10 ng de ADN genómico, 150 μ M de cada dinucleótido (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 3,5 mM de $MgCl_2$, 12 mM de Tris HCl (pH 8,3), 12 mM de KCl, 1,0 μ M de "primer" y 3 unidades de Taq Stoffel Fragment (Perkin Elmer).

Para cada muestra, se colocó en sendos tubos Eppendorf de 200 μ l: 10 μ l de la solución maestra (Apéndice 4) y 5 μ l de cada uno de los siguientes ingredientes: taq polimerasa, "primer" y el ADN respectivo.

Para la amplificación del ADN se utilizaron "primers" de diferentes casas comerciales como Operon Technology INC. y de University of British Columbia (UBC). Los "primers" fueron diluidos hasta obtener una solución madre de 25 μ M, para lo que se consideró su peso molecular y el contenido del tubo provisto por la casa comercial.

De la serie Operon, se evaluaron las series: OPA, OPB, OPC, OPD, OPE, OPF y algunos OPH, cada una constituida por 20 "primers". De la serie de UBC, se evaluaron las series: 101-200, 201-300, 601-700 y 701-800. También se evaluaron otros "primers" tales como: el I7, N20, X9, X16 M4, J19 y L18.

Se hizo pruebas para determinar cual concentración de "primer" producía la mejor amplificación. Para esto se partió de los tubos iniciales. Se hizo el cálculo del peso molecular de cada "primer", dependiendo de la presentación comercial. Se le agregó TE para hacer la solución madre, a partir de ésta se hizo diluciones para obtener diferentes concentraciones, según se deseaba probar: 0,6; 0,7 y 1,0 μ M en el volumen final de reacción.

La evaluación para determinar si los "*primers*" producían polimorfismos de interés se hizo de la siguiente manera. Se evaluó cada "*primer*" a la concentración previamente seleccionada, usando dos genotipos (de El Salado y de Parque Soberanía), los cuales fueron seleccionados por proceder de sitios distantes. Cuando no se detectaban polimorfismos, se repetía la evaluación usando otros cinco genotipos (San Antonio, Kéköldi, La Chachalaca, Matapalo y Chirilagua) que representaban las diferentes procedencias geográficas bajo estudio. Si aún no era factible identificar polimorfismos, se eliminaba el "*primer*". Si se detectaba al menos un polimorfismo de interés, se evaluaba toda la población con este "*primer*". Para ahorrar tiempo, en cierto momento se decidió eliminar la selección inicial con dos genotipos, evaluando los "*primers*" directamente con el grupo de cinco.

La amplificación del ADN se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600. El programa utilizado fue:

- Un ciclo inicial de desnaturalización del ADN de 3 minutos a 94 °C.
- 45 ciclos compuestos cada uno por la siguiente secuencia:
 - 30 segundos a 94 °C (desnaturalización)
 - 45 segundos a 36°C (unión del iniciador a los sitios complementarios de la cadena disociada de ADN)
 - 2 minutos a 72°C (síntesis de la cadena en una dirección específica)
- Un ciclo final de 4 minutos a 72°C.

3.2.4. Visualización de los productos de la amplificación

Luego del procedimiento RAPD, se procedió a realizar la electroforesis en gel de agarosa a 1,8%. Se colocó 25 µl de la reacción PCR en cada pozo del gel en la cámara de electroforesis, se dejó migrar aproximadamente durante dos horas a 150 voltios. Al finalizar la migración del ADN se colocó el gel en una cubeta con solución de bromuro de etidio por una hora y a continuación se colocó en agua limpia para eliminar el exceso de colorante.

Los patrones de bandas fueron observados en la cámara de luz ultravioleta UV 320. Se tomaron las respectivas fotografías para realizar la calificación de las bandas polimórficas según los "primers" seleccionados. A la banda presente se le asignó un uno (1) y un cero (0) cuando no estuvo presente.

3.2.5. Análisis estadístico de los datos moleculares

En la Figura 3 se muestran los análisis estadísticos realizados en esta fase a partir de la recolección de datos.

3.2.5.1. Matriz de similitud y distancias genéticas

Para obtener la matriz de similitud y distancias se utilizó el algoritmo de Nei y Li (1978) y el software PopGene (Yeh *et al.* 1997).

Para calcular el coeficiente de similitud se utilizó la siguiente fórmula:

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

donde:

S = coeficiente de similitud

a = número de bandas presente en ambos genotipos

b = número de bandas presente solo en el genotipo 1

c = número de bandas presentes en el genotipo 2

La definición de similitud excluye los fragmentos que están ausentes en ambos genotipos, debido a que la doble ausencia no puede ser atribuida a una causa común. La matriz de similitud fue analizada por el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Averages), con el software PopGene (Yeh *et al.* 1997).

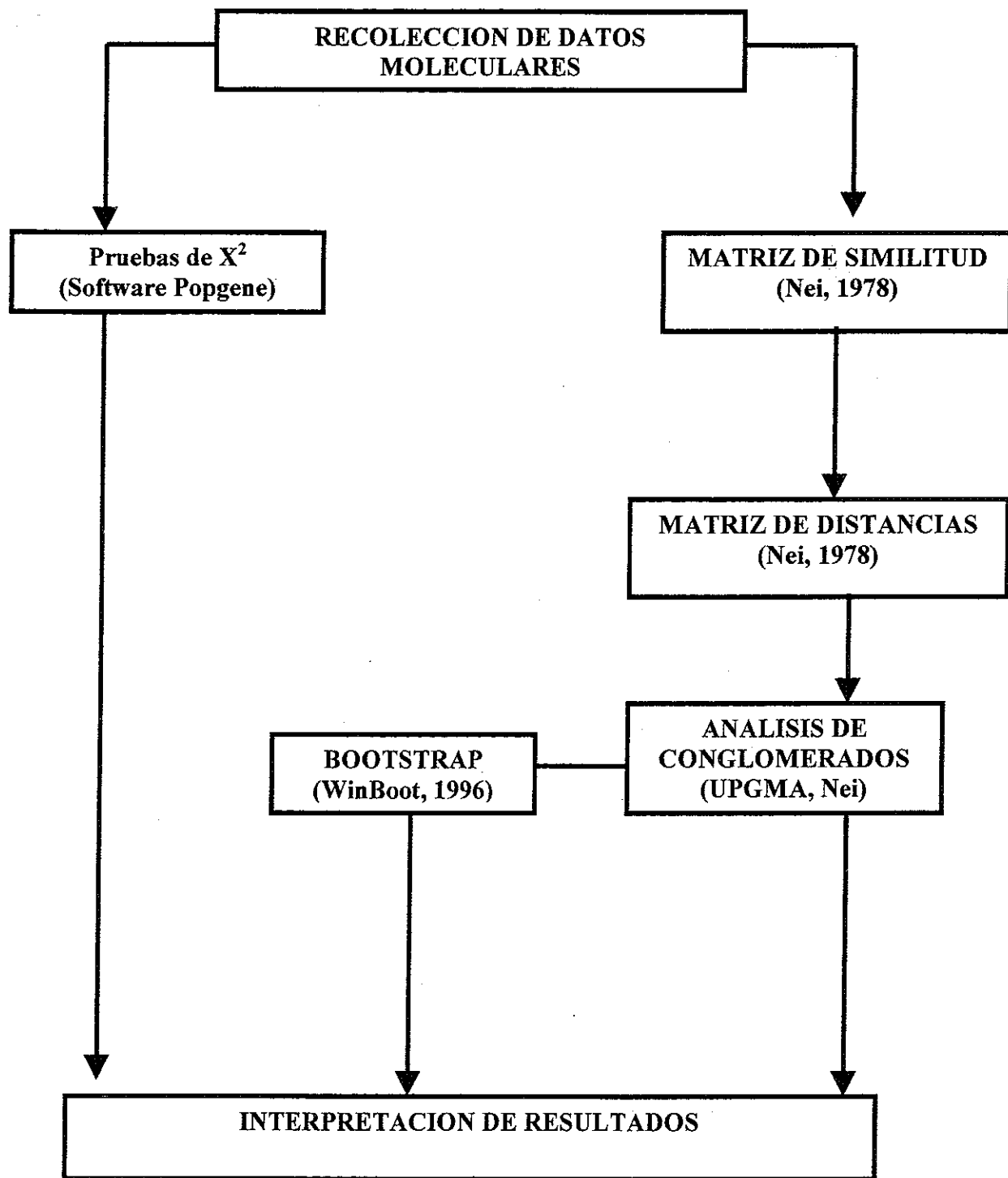


FIGURA 3. Diagrama de flujo para el análisis de datos moleculares generados mediante la metodología RAPDs en la caracterización molecular de *Quassia amara*. (Tapia, 1998).

La variación genética entre y dentro de grupos se analizó con la fórmula de Nei (1978), la cual toma en consideración un factor de corrección produciendo un resultado insesgado de la medida de identidad y de distancia genética corregido para cuando se trabaja con poblaciones pequeñas. El dendograma de clasificación de los grupos genéticos está basado en el índice de similitud de Nei (1978) con el método UPGMA modificado por Neighbour con el procedimiento de Philip Versión 3,5 del software PopGene 1.32 (©University of Alberta and Center For International Forestry Research).

Después de calcular el coeficiente de similitud se calculó la distancia que es una función decreciente de la similitud.

Se utilizó la siguiente fórmula: $D_1 = 1 - S$

3.2.5.2. " Bootstrap"

La base de datos moleculares fue transformada al formato que sugieren Yap y Nelson (1996) para procesar los datos en el programa para análisis bootstrap con el programa computacional WinBoot (1996). El número de muestras con el cual se calculó el valor promedio para las distancias fue de 2,000. En el cual se obtuvo un dendograma que aportó la fuerza de los brazos de las agrupaciones obtenidas en el dendograma del programa PopGene (Yeh *et al.* 1997).

Para identificar las bandas polimórficas que más aportan para la diferenciación de los genotipos se utilizó las pruebas de λ^2 obtenidas en el análisis por grupos en el segundo dendograma, utilizando el software Popgene. Se utilizó el mismo programa para determinar los marcadores moleculares discriminantes entre genotipos y entre los grupos evaluados.

4. RESULTADOS Y DISCUSION

4.1. FASE DE CAMPO

4.1.1. Sitios de colecta

En esta fase se hizo el muestreo en 11 sitios, los cuales se indican en la Figura 1 de materiales y métodos. La mayoría de los sitios están ubicados en Costa Rica, debido a la facilidad para llevar a cabo las colectas en este país y por la mayor disponibilidad de información sobre la distribución y ubicación geográfica de poblaciones silvestres de *Q. amara*, producto de estudios realizados anteriormente.

A continuación se describe cada una de las poblaciones muestreadas.

San Antonio (Guatemala): La población de San Antonio (Guatemala) está ubicada en un bosque seco, con una temperatura promedio y una precipitación anual de aproximadamente 25-28°C y 1300 mm, respectivamente. La topografía es quebrada, con lomas acentuadas. En los puntos de muestreo se encontró pocos arbustos cerca de una quebrada. Esta población ya había sido estudiada en forma anterior por Upegui (1998). Para llegar al sitio, se contó con el apoyo de personas del proyecto Olafo en Guatemala.

El Salado (Honduras): La población de El Salado (Honduras) corresponde una parte a bosque secundario y de galería, una gran parte a potreros, con muchas plantas cortadas en su eje principal y con muchos rebrotes. Se encuentran también plantas adultas con muchos rebrotes a la orilla de los ríos que pasan por la zona. Al momento de la colecta en mayo, todas los arbustos muestreados presentaban hojas nuevas, solamente se encontró una planta con escasa fructificación. En los demás arbustos del área muestreada no se encontraron signos de floración o fructificación. La topografía del área es quebrada. La temperatura oscila entre 26-30°C. Esta población al igual que la de San Antonio, ya estaba siendo objeto de estudio por parte del Proyecto Olafo. El guía en este sitio fue el Ing. Oscar Castillo de dicho proyecto.

Chirilagua (El Salvador): La colecta se hizo en las propiedades de la Cooperativa de la Reforma Agraria La Marañonera (CORALAMA), Cantón Tierra Blanca, municipio de Chirilagua. Depto. de San Miguel, El Salvador. La Zona de vida es Bosque húmedo Subtropical, con biotemperatura de 24°C (Mapa Ecológico de El Salvador, MAG, Febrero, 1978). El permiso de entrar a colectar al sitio se obtuvo con el Sr. José Manuel Rodríguez, encargado de la Cooperativa. La población de *Q. amara* se encuentra en un reducto de bosque secundario al pie de una montaña, la zona es quebrada. Hay una población de más de 50 arbustos. Las plantas se encuentran en pendientes y áreas planas cerca de quebradas, por las que en época lluviosa, seguramente corre agua. Algunas plantas se encuentran en claros entre arbustos, estas plantas presentan varios rebrotes y poca altura; otros arbustos con pocos rebrotes, se encuentran bajo árboles grandes. Al momento de la colecta, la mayoría de los arbustos presentaba fructificación. Esta población fue seleccionada por ser la única a la que se tenía acceso en comparación con otros sitios identificados. No parece ser una población muy antigua.

Santa Cecilia (La Cruz, Costa Rica): pertenece al cantón de La Cruz de Guanacaste, en la finca de la empresa Guanaranja. Se eligió esta población porque había sido previamente identificada por Villalobos (1995) y era un sitio accesible. La población se encuentra a la orilla del río Mena. En el sitio hay muchas plantas pequeñas a nivel de sotobosque. Las plantas adultas presentan muchos rebrotes, signo de su explotación en esa zona, el tipo de vegetación es un bosque de galería.

La Chachalaca (Bocas de San Carlos, Costa Rica): Se encuentra en la finca La Chachalaca, cerca del río San Juan, frontera con Nicaragua. Allí hay un conglomerado de más de 50 arbustos dentro del bosque primario. Los arbustos son altos, con uno, dos o tres ejes principales, se encuentran muy pocos arbustos con rebrotes. Debido a que se encuentran bajo el dosel de árboles muy altos, los arbustos de *Q. amara* no reciben mucha luz directa, por lo que fue difícil encontrar arbustos con suficiente floración y fructificación para realizar la evaluación de éstos órganos. Esta población incluyó porque esta siendo objeto también de un estudio fenológico por parte del proyecto Olafo. Es una población

antigua. La precipitación media anual del sitio se estima en 3000 mm en un periodo de 8 a 11 meses al año. Se clasifica como Bosque Húmedo Tropical (Holdridge, 1967).

La Pacífica (Cañas, Costa Rica): Se encuentra en la hacienda La Pacífica, reserva privada con fines turísticos y de explotación ganadera. Corresponde al bosque de galería del río Corobicí. La población se encuentra desde la orilla del cauce hasta áreas de potrero o charral (Villalobos, 1995). La zona de vida de este sitio es bosque seco tropical. La temperatura media anual es de 26°C. La precipitación media anual 1693 mm. Esta finca es un área estacionalmente seca, con seis meses de sequedad. Es una población relativamente nueva (Brown, 1995).

Surtubal (Turrubares, Costa Rica): La población de Surtubal corresponde a un bosque de galería. Es un reducto a la orilla de la carretera. Es posible encontrar pocas plantas en una área de unos 500 m². Al momento de la colecta se encontraron plantas con hojas nuevas. No había floración ni fructificación. Aparentemente los arbustos son muy jóvenes y su altura es relativamente baja. Las plantas se encuentran en un claro con incidencia de luz. Aparentemente, es una población muy reciente en este sitio. Se seleccionó el sitio porque representa una de las poblaciones de la zona Pacífica.

Kéköldi (Talamanca, Costa Rica): Corresponde a un área disturbada, con abundante luz. La Reserva indígena Kéköldi se clasifica como bosque tropical húmedo caliente. La temperatura promedio anual es de 26°C y la precipitación media anual de 2,000-3,000 mm (Ling, 1995). Las plantas de este sitio son adultas con muchos rebrotes. Al momento de la colecta, los arbustos se encontraban en floración y fructificación. La mayoría de las plantas muestreadas presentaban hojas nuevas, muy grandes y con 7 folíolos. Esta es una población muy antigua en esa zona. Se seleccionó este sitio por representar a la zona Atlántica de Costa Rica.

Matapalo (Aguirre, Costa Rica): El área corresponde a un bosque del pacífico húmedo. La precipitación media anual es de 4006 mm. La temperatura media anual es de 27,6°C. La zona de vida es de bosque tropical húmedo. Está a la orilla de un río que

desemboca en el mar. Es posible encontrar plantas adultas, con tres o más rebrotes. Esta población está siendo actualmente evaluada fenológicamente por el proyecto Olafo, además que posee un buen acceso. Esta área no ha sido perturbada en 40 años o más (Brown, 1995).

Isla Barro Colorado (Panamá): La isla de Barro Colorado está ubicada en la cuenca del Canal de Panamá. Cuenta con 1500 ha cubiertas de bosque tropical y una fauna casi intacta. Se encuentra entre 200-300 msnm con precipitación promedio anual de 2548 mm y temperatura promedio de 27°C. La zona de vida es de bosque tropical húmedo. La población de *Q. amara* está ubicada en un área quebrada. Se encontró muchas plantas jóvenes dispersas a lo largo del sendero hacia el área denominada el "Plot". Para la caracterización no se encontró muchas plantas con el diámetro de tronco mínimo para el estudio, por lo que solamente se evaluaron algunas de ellas. Esta población se considera que representa a la zona Atlántica. El área del "Plot" es de crecimiento antiguo, y puede no haber sido perturbado significativamente por cinco siglos (Brown, 1995).

Parque Soberanía (Panamá): La población de *Q. amara* aquí es totalmente silvestre, y posiblemente poco disturbada. La persona guía hacia el bosque fue Alberto Jiménez (INRENARE). La población se encuentra en el sector del oleoducto. Se pasa por el río Frijol, luego el río Frijolito y queda a 1 Km a mano izquierda. Se encontraron pocas plantas a la orilla de la carretera. El sitio queda muy cerca del área del canal de Panamá, y relativamente cercana a la Isla de Barro Colorado.

Penonomé (Panamá): se colectó material vegetal de este sitio para la caracterización molecular. Esta es una población pequeña, en un bosque secundario. Al momento de la colecta, la fructificación había pasado recientemente. Las plantas presentaban pocas hojas adultas y tenían brotes foliares nuevos. Las plantas son de poca altura y tienen rebrotes, es evidente que esta población es utilizada por las personas de la zona. El material colectado se tomó en representación de zona Pacífica.

Además de los sitios descritos, en el análisis molecular se incluyeron dos genotipos individuales que corresponden a Buenos Aires (Osa, Costa Rica) y a San Pablo (Turrubares, Costa Rica). En estos casos, la muestra estuvo conformada por un solo arbusto que en el caso de Buenos Aires, la población silvestre se encuentra en las márgenes del río Volcán, según la persona entrevistada. En el caso de San Pablo Turrubares, el arbusto proviene de una población silvestre de unos 20 árboles.

En el caso de La Lupe (Río San Juan, Nicaragua), solamente se utilizó material vegetal colectado por Upegui (1998) para la caracterización molecular. Se estima una precipitación anual de 3000 mm distribuidos en un periodo de ocho a once meses al año. Se clasifica como un bosque húmedo tropical. El suelo es quebrado. Este sitio presenta cobertura de bosque primario selectivamente intervenido.

En Canalete (Upala, Costa Rica) y San Emilio (Los Chiles, Costa Rica) solamente se colectó material vegetal para la caracterización molecular. En Canalete la precipitación promedio anual es de 2500 mm y en San Emilio, es de 2885 mm. En ambos sitios se tienen tres meses secos. La zona de vida es Bosque Húmedo Tropical.

Como puede notarse en la información mencionada existe una amplia variación de tipo climático y geográfico entre los sitios. Nueve pueden asumirse como afectados por las condiciones del Pacífico, estos son San Antonio (Guatemala), Chirilagua (El Salvador), La Pacífica (Cañas, Costa Rica.), Surtubal y San Pablo (Turrubares, C.R.) estos afectados por el Pacífico Seco; Matapalo (Aguirre, C.R.), Buenos Aires (Osa, C.R.) y probablemente Penonomé (Panamá), afectados por el Pacífico lluvioso. Cuatro sitios están afectados por la condición del Atlántico: El Salado (Honduras), Kéköldi (Talamanca, C.R.), Isla Barro Colorado y Parque Soberanía (Panamá); y cuatro por el Centro Norte de Costa Rica: La Lupe (Nicaragua), La Chachalaca (Bocas de San Carlos, C.R.), San Emilio (Los Chiles, C. R.) y Canalete (Upala, C. R.).

En cuanto a la altitud (Cuadro 1) se puede indicar que las poblaciones evaluadas se encuentran entre los 50 (Matapalo, Aguirre C.R.) y los 650 msnm (San Antonio,

Guatemala). Esta última altitud llama la atención pues según Villalobos (1995), *Q. amara* comúnmente se encuentra a alturas por debajo de los 500 msnm, en Costa Rica. Esto podría deberse a que se trata de una población establecida y no silvestre. Aunque Brown (1995) menciona que existen muestras de Nicaragua encontradas entre los 600-900 msnm.

Aunque hubiera sido ideal tener una representación más amplia de sitios de colecta en Nicaragua, Honduras, El Salvador y Guatemala, esto no fue posible debido principalmente a las limitaciones económicas y de tiempo que con frecuencia se tienen para este tipo de investigaciones. También es importante tener presente que el difícil acceso a los sitios en donde normalmente se encuentra *Q. amara* en forma silvestre, hace más difícil las colectas y las encarece.

Se trató de conseguir también muestras de *Q. amara* procedente de jardines botánicos en otros países latinoamericanos como México, Colombia, Venezuela, Ecuador, etc., lo cual permitiría comparar el acervo mesoamericano con el de otras regiones, pero los resultados fueron infructuosos. Se enviaron fotos de diferentes partes de la planta para facilitar su reconocimiento, pero a pesar de esto, las muestras recibidas (de Venezuela y de Ecuador), correspondieron a otras especies.

4.1.2. Descriptores morfológicos

En forma inicial se determinaron 44 posibles descriptores de *Q. amara*, a saber 21 parámetros de hoja, nueve de flor, diez de fruto y cuatro de semilla. En la determinación de estos descriptores se puso énfasis en los parámetros de hoja, porque a diferencia de los otros órganos, las hojas siempre están presentes en las plantas silvestres. Por el contrario, las flores, frutos y semillas tienen un comportamiento estacional.

En la mayoría de las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente. Según Enríquez, (1991) los órganos ideales son la flor y el fruto y les siguen en importancia, las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar.

Aunque se ha indicado que la floración ocurre entre los meses de setiembre y marzo y que este fenómeno requiere de la exposición a la luz (Ling, 1995), lo cierto es que aún no se conoce con exactitud la fenología de *Q. amara* en los diversos ambientes en que se encuentra creciendo. Esta desinformación hace difícil la planificación de colectas tendientes a evaluar todos los órganos de la planta. Ya se han iniciado esfuerzos por parte del Proyecto Olafo del CATIE para tratar de establecer mejor la fenología de la planta en diferentes condiciones ecológicas. También sería oportuno establecer bancos de germoplasma en donde se pueda evaluar la fenología y otras características de las plantas bajo condiciones similares de clima y suelo.

Se determinó el nivel de variación de los 44 parámetros inicialmente definidos y se encontró que muchos de ellos no aportaban información relevante por lo que fueron eliminados. Este fue el caso para los siguientes descriptores de hoja: ancho del peciolo, ancho del raquis, longitud del ápice del foliolo terminal y ancho de la base del ápice del foliolo terminal. Para la flor se eliminó el color distal y proximal del pétalo y se incluyó el color de la parte media del pétalo. Para el fruto, se eliminó el color de la drupa madura y de la drupa inmadura. Para la semilla, el color.

A continuación se darán detalles de los parámetros finalmente seleccionados para la caracterización morfológica de *Q. amara*, así como particularidades para la medición de dichas variables.

El formulario de evaluación que se diseñó para llevar a cabo las evaluaciones resultó muy útil y práctico, pues en gran medida facilitó el proceso de toma y organización de la información. Dicho formulario se muestra en el Apéndice 5.

4.1.2.1. Descriptores de la hoja

Los descriptores que se seleccionaron para la hoja, se muestran en forma gráfica en la Figura 4. En el Apéndice 6 se presenta una descripción más detallada de cada uno de ellos. La mayoría corresponde a la longitud y ancho de las diferentes estructuras que componen la hoja tales como el peciolo, raquis y folíolos.

Para uniformizar la evaluación de las hojas, resultó de mucha importancia seleccionar solamente aquellas con cinco folíolos, pues fue evidente que a pesar de que este tipo de hojas es la más frecuente, con cierta regularidad aparecen hojas con otras cantidades como tres, cuatro, seis y siete folíolos, variantes que pueden ser observadas en la Figura 5. Es importante indicar que en el caso de la población de Kéköldi, muchas de las hojas nuevas que se producían luego de la fructificación, además de ser de mayor tamaño tenían siete folíolos. Este fenómeno debería ser estudiado mejor y relacionado con las condiciones climáticas.

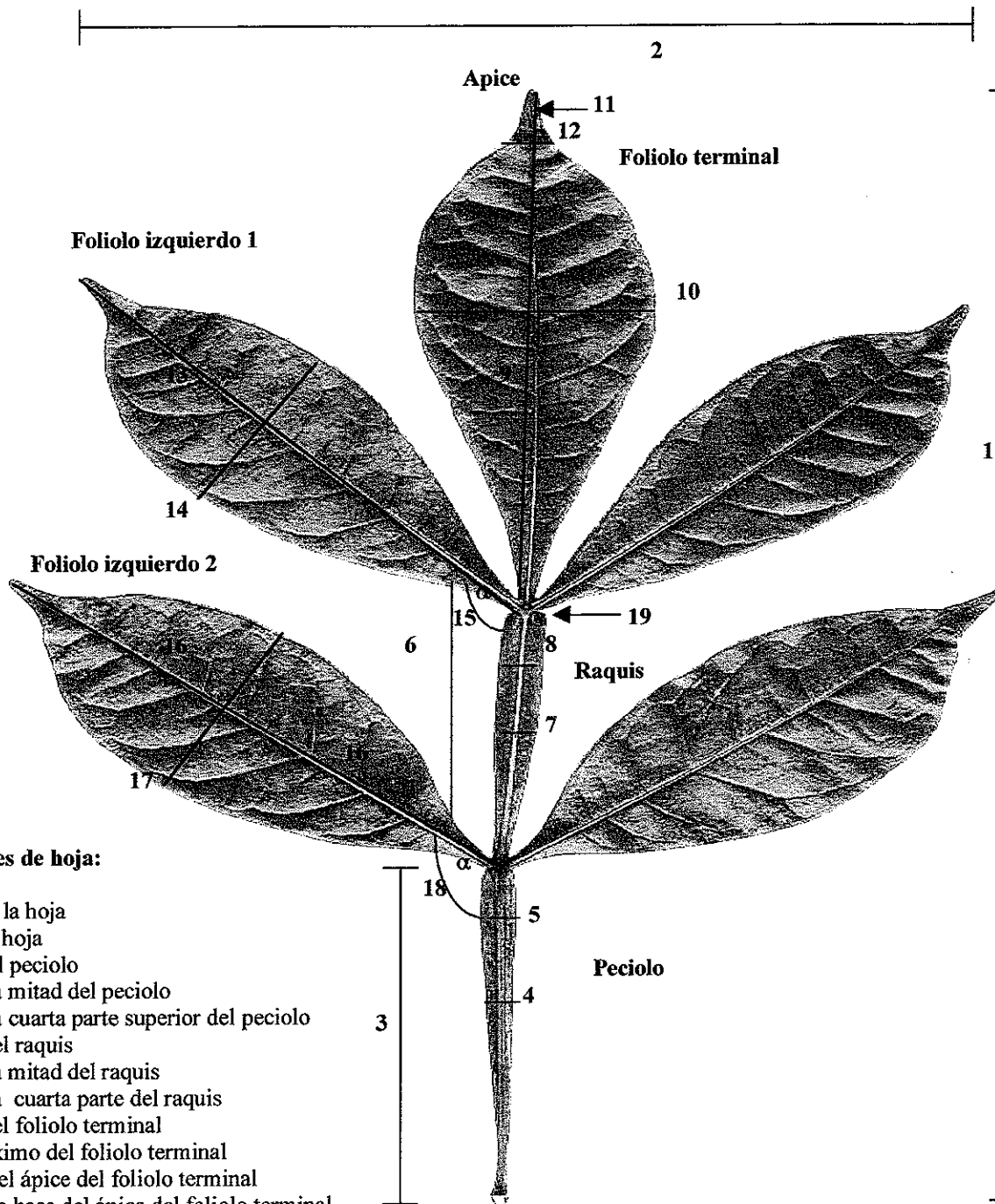
4.1.2.2. Descriptores de la flor

Los descriptores seleccionados para la evaluación de la flor se presentan en forma gráfica en la Figura 7. Para una mejor comprensión sobre la toma de los datos respectivos, se presenta en el Apéndice 7 una descripción detallada de cada uno de ellos. No fue posible evaluar los descriptores de flor en todos los sitios, debido a que al momento de la visita, ya había pasado la floración.

4.1.2.3. Descriptores del fruto y de la semilla.

En la Figura 8 se presentan los descriptores seleccionados para la caracterización del fruto. Al igual que para flor, no fue posible evaluar estos descriptores en todos los sitios. El color de la drupa madura e inmadura no fue evaluado porque se decidió que se evaluarían sólo frutos con semillas bien desarrolladas, los cuales se distinguen por ser negruzcos y por poseer una pulpa amarilla que se deshace fácilmente con la mano.

A partir de los frutos seleccionados se extrajeron las semillas para hacer la evaluación de los datos respectivos, como son longitud, ancho medio y forma de la semilla (Apéndice 7). Dado que sólo se presentó un color de la semilla que fue 2.5 GY 8/4 (Munsell, 1963), se eliminó este parámetro.



Descriptores de hoja:

1. Longitud de la hoja
2. Ancho de la hoja
3. Longitud del peciolo
4. Ancho en la mitad del peciolo
5. Ancho en la cuarta parte superior del peciolo
6. Longitud del raquis
7. Ancho en la mitad del raquis
8. Ancho en la cuarta parte superior del raquis
9. Longitud del foliolo terminal
10. Ancho máximo del foliolo terminal
11. Longitud del ápice del foliolo terminal
12. Ancho de la base del ápice del foliolo terminal
13. Longitud del foliolo izquierdo 1
14. Ancho máximo del foliolo izquierdo 1
15. Angulo del Inserción del foliolo Izquierdo 1
16. Longitud del foliolo izquierdo 2
17. Ancho máximo del foliolo izquierdo 2
18. Angulo de inserción del foliolo izquierdo 2
19. Color del punto de inserción del foliolo terminal
20. Color del haz del foliolo terminal
21. Color del envés del foliolo terminal

FIGURA 4. Descriptores de la hoja de *Quassia amara*.

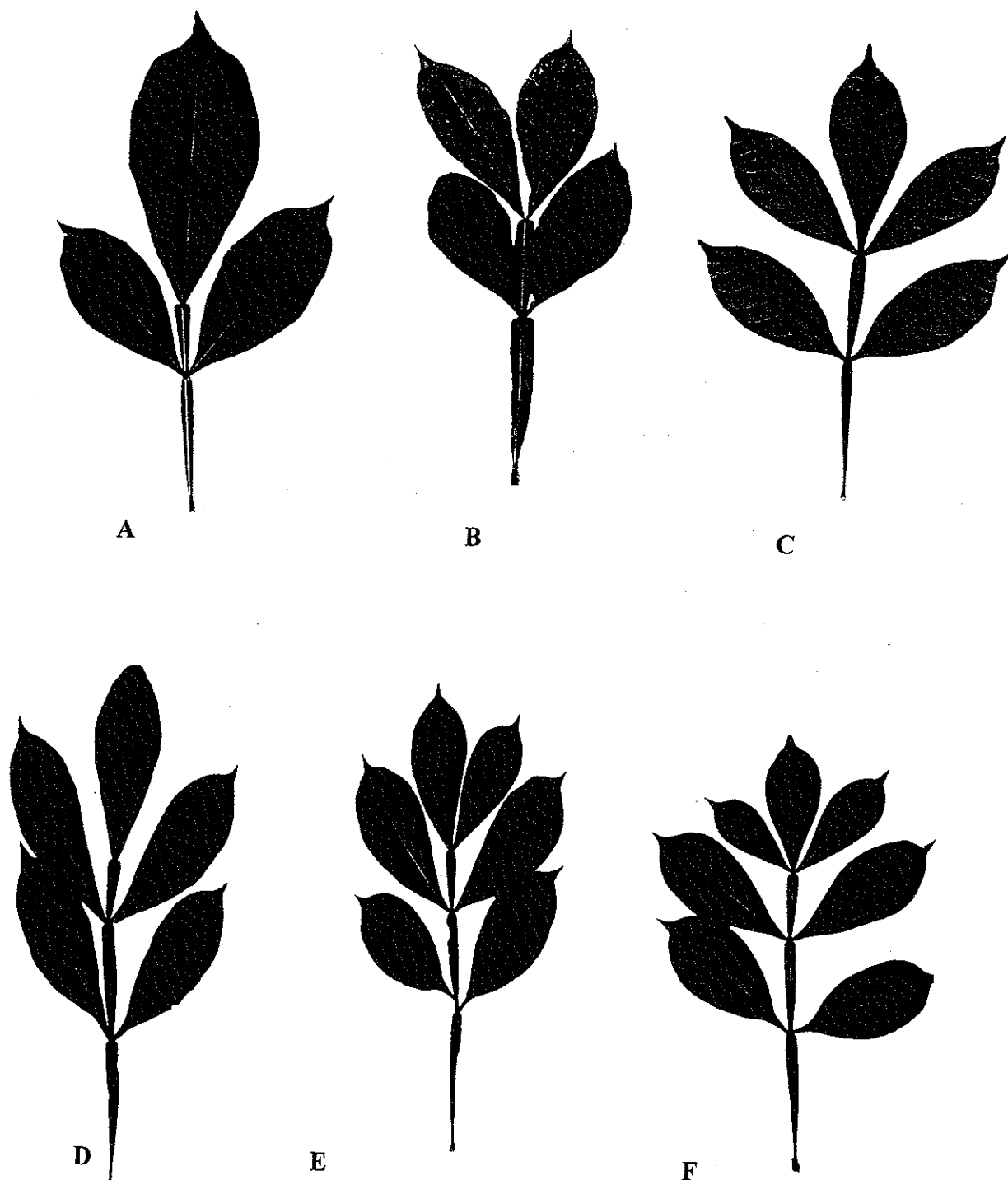
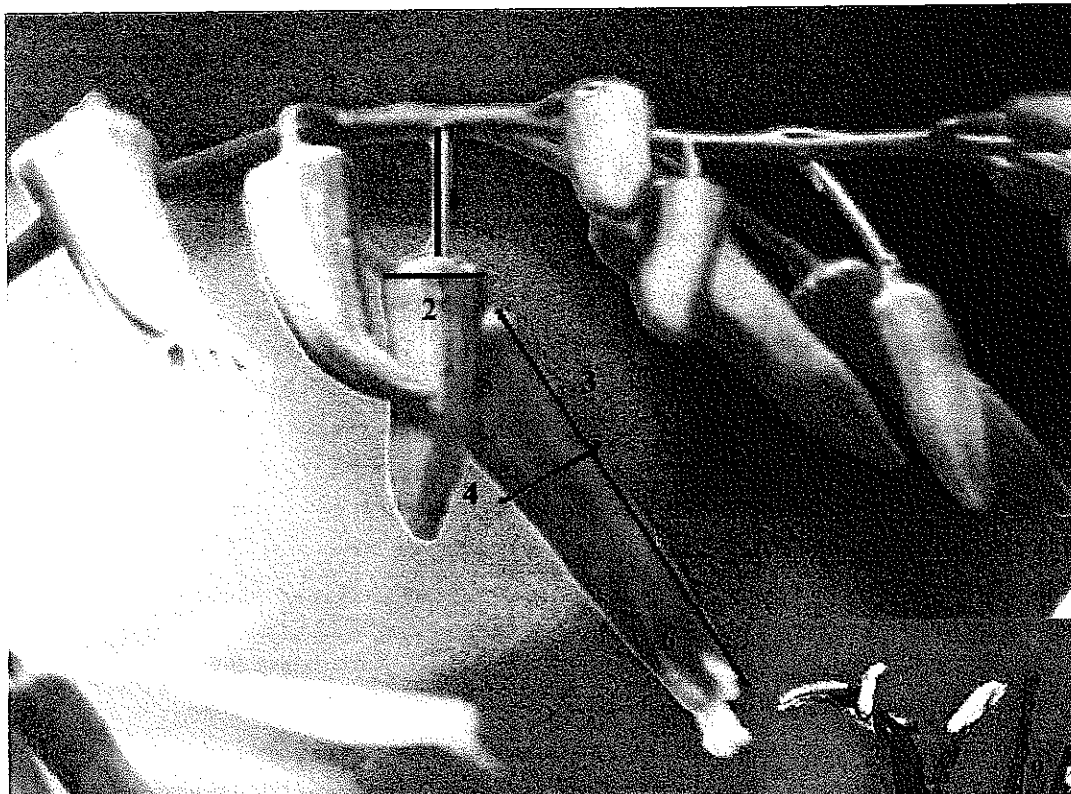


FIGURA 5. Hojas de *Quassia amara* con diferente número de foliolos: A: tres foliolos; B: cuatro foliolos; C: cinco foliolos (común); D: cinco foliolos y dos raquis; E: seis foliolos; F: siete foliolos.

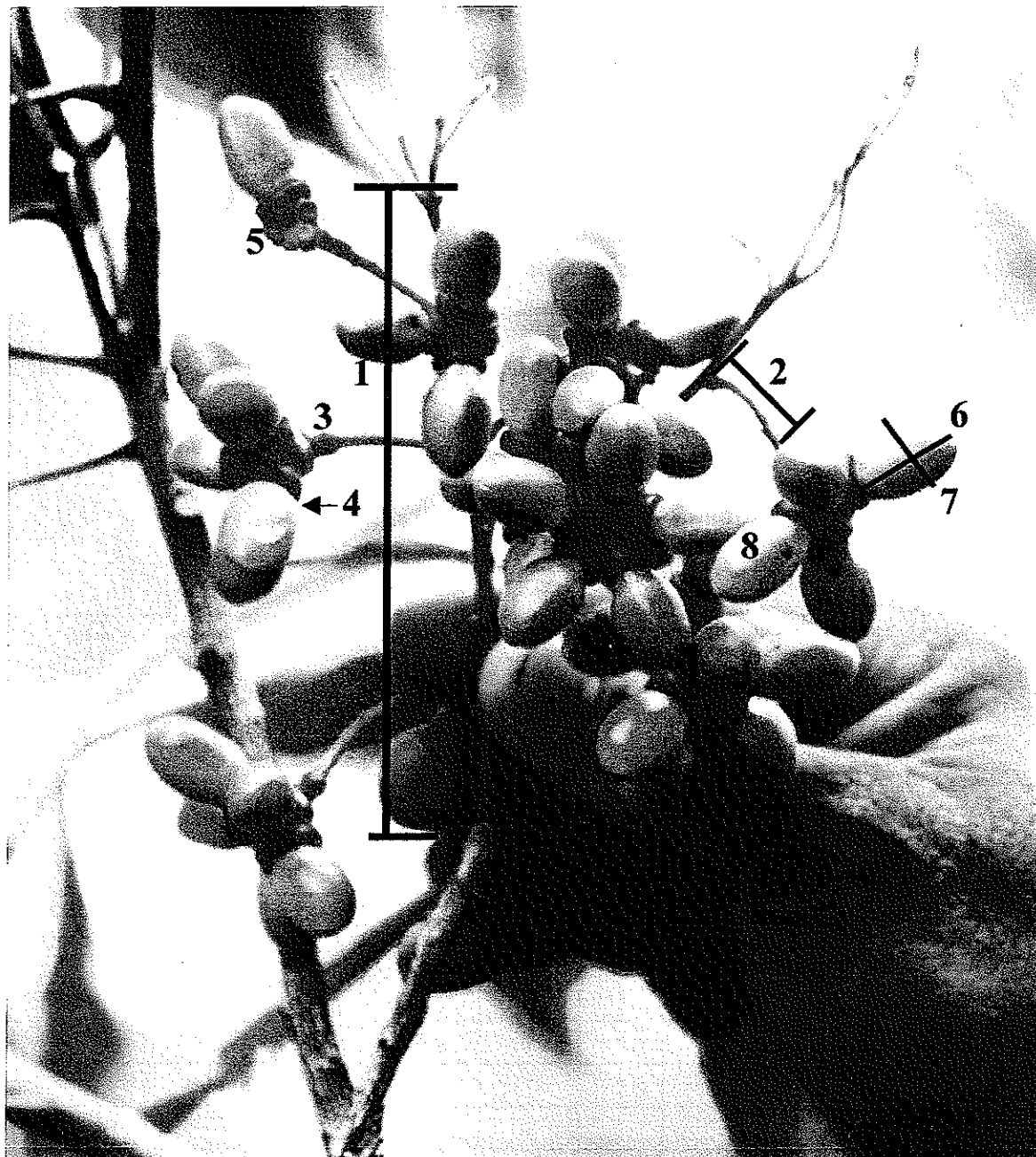


Descriptoros:

1. Longitud del pedicelo
2. Ancho de la base de la corola
3. Longitud de los pétalos
4. Ancho a la mitad del pétalo
5. Color del extremo proximal del pétalo
6. Color del extremo distal del pétalo
7. Número de estambres
8. Longitud de los estambres
9. Longitud del gineceo



FIGURA 6. Descriptoros de la flor de *Quassia amara*.



Descriptores del fruto:

- | | |
|---|--------------------------------|
| 1. Longitud del eje central | 6. Longitud de la drupa |
| 2. Longitud del pedúnculo | 7. Ancho máximo de la drupa |
| 3. Forma de la base del receptáculo | 8. Forma de la drupa |
| 4. Forma de imbricación de la drupa en el receptáculo | 9. Color de la drupa madura |
| 5. Color del receptáculo | 10. Color de la drupa inmadura |

FIGURA 7. Descriptores del fruto de *Quassia amara*.

4.1.3. Material Vegetal

En el Cuadro 2 se anota el tipo de material vegetal evaluado para cada sitio de colecta, así como el número de órganos estudiados por planta. Debido a que no existía suficiente información previa para definir el tamaño más adecuado de muestra para cada parámetro, se optó por definir inicialmente uno que se ajustara a las posibilidades del ensayo y del investigador. Con el objeto de contar con mayores elementos de juicio para futuras investigaciones, se utilizó la información recolectada para definir el tamaño de muestra más adecuado para cada una de las variables evaluadas, tal como se indicará más adelante.

CUADRO 2. Fecha de colecta y material vegetal evaluado de *Q. amara* en cada sitio de muestreo.

Sitios	Fecha colecta 1999	# plantas evaluadas	Cantidad de órganos evaluados por planta					
			Hojas	Flores		Frutos		Semillas
				Inflorescencias	Flores	Infrutescencias	Frutos	
San Antonio	Febrero	12	10	18	40	25	51	0
El Salado	Mayo	12	10	-	-	7	9	10
Kéköldi	Febrero	12	10	16	63	20	48	47
La Pacífica	Abril	12	10	-	-	-	-	-
La Chachalaca	Abril	12	10	-	-	-	-	-
Matapalo	Abril	12	10	-	-	-	-	-
Santa Cecilia	Abril	12	10	-	-	-	-	-
Surtubal	Marzo	4	10	-	-	-	-	-
Parque Soberanía	Marzo	5	10	-	-	-	-	-
Isla Barro Colorado	Marzo	6	10	-	-	-	-	-
Chirilagua	Mayo	12	10	2	6	36	79	100

4.1.4. CARACTERIZACION MORFOLOGICA

4.1.4.1. Agrupamiento de los individuos según los datos morfológicos

A partir de las variables cuantitativas de hoja y usando el método de Gower (1962) del programa estadístico SAS, se obtuvieron cuatro grupos de individuos. Las relaciones entre la totalidad de pares de individuos fueron observadas mediante la distancia ponderada de la combinación de coeficientes de distancia para los caracteres cuantitativos. La distribución en los grupos de las plantas evaluadas se indica en el Cuadro 3.

CUADRO 3. Distribución por grupo de individuos de *Q. amara* según análisis de varianza mínima de Ward.

CODIGO	SITIO	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
31	San Antonio				12
41	El Salado		10	1	1
61	Kéköldi			4	8
62	La Pacífica	12			
63	La Chachalaca			12	
64	Matapalo	3	1	8	
66	Santa Cecilia	8		3	
69	Surtubal	2		2	
72	Parque Soberanía				5
73	Barro Colorado			1	5
81	Chirilagua	9	3		

El algoritmo multivariado del análisis *cluster* de varianza mínima de Ward (1963), actuó sobre la matriz de distancia. En cada grupo se tiene predominancia de la mayoría de los individuos de uno o dos sitios.

Se encuentran individuos de algunos sitios que se agrupan en dos o tres grupos como los de Chirilagua, Surtubal, Matapalo, Kéköldi y El Salado. Así, en el grupo uno se agrupan

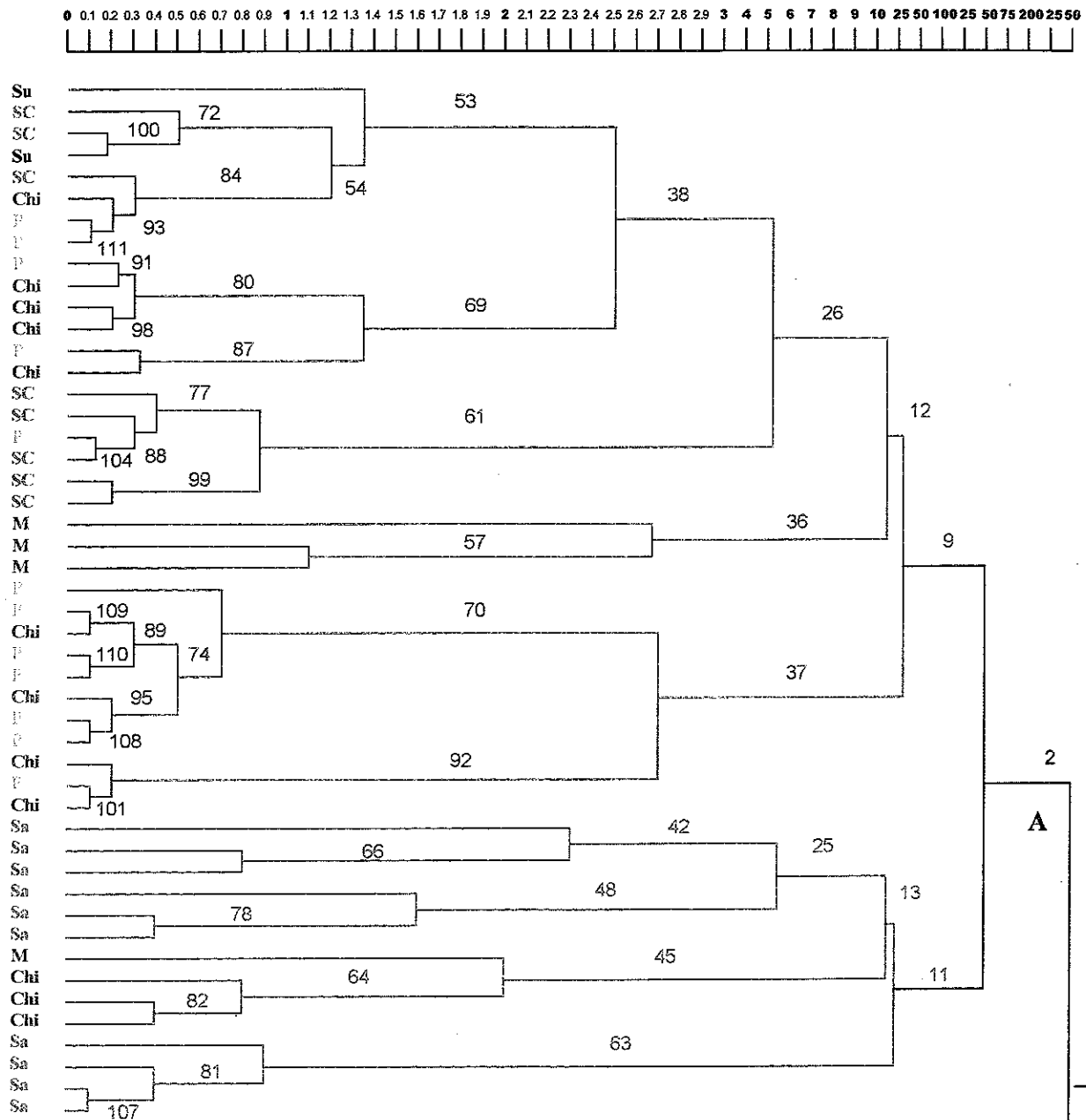
materiales de los sitios: La Pacífica (12 individuos), Chirilagua (9), Santa Cecilia (8), Matapalo (3) y Surtubal (2). En el grupo dos, se encuentran individuos de: El Salado (10) y Chirilagua (3), además un individuo de Matapalo. En el grupo 3, se ubican los individuos de La Chachalaca (12), Matapalo (8), Kéköldi (4), Santa Cecilia (2), Surtubal, un individuo de El Salado y uno de Barro Colorado. En la agrupación número cuatro se encuentran materiales de San Antonio (12), Kéköldi (8), Parque Soberanía (5) y Barro Colorado (5). Lo anterior denota que no existe un patrón geográfico característico definido para estos materiales.

4.1.4.2. Estructura de los agrupamientos

La estructura taxonómica obtenida por la matriz de distancia con el agrupamiento jerárquico de Ward (1963), se representa gráficamente por medio del fenograma de la Figura 8, lo que permite observar la relación en grado de disimilitud entre los individuos. Se observan dos grandes grupos (A y B) que a su vez se subdividen en dos subgrupos.

El sub-grupo A1 está conformado principalmente por la mayoría de los árboles de La Pacífica, Matapalo, Santa Cecilia, Surtubal y Chirilagua, todos ellos ubicados en sitios con influencia de las condiciones del Pacífico. El sub-grupo A2 está constituido mayoritariamente por arbustos de El Salado (costa atlántica de Honduras), y algunos individuos de Chirilagua (El Salvador).

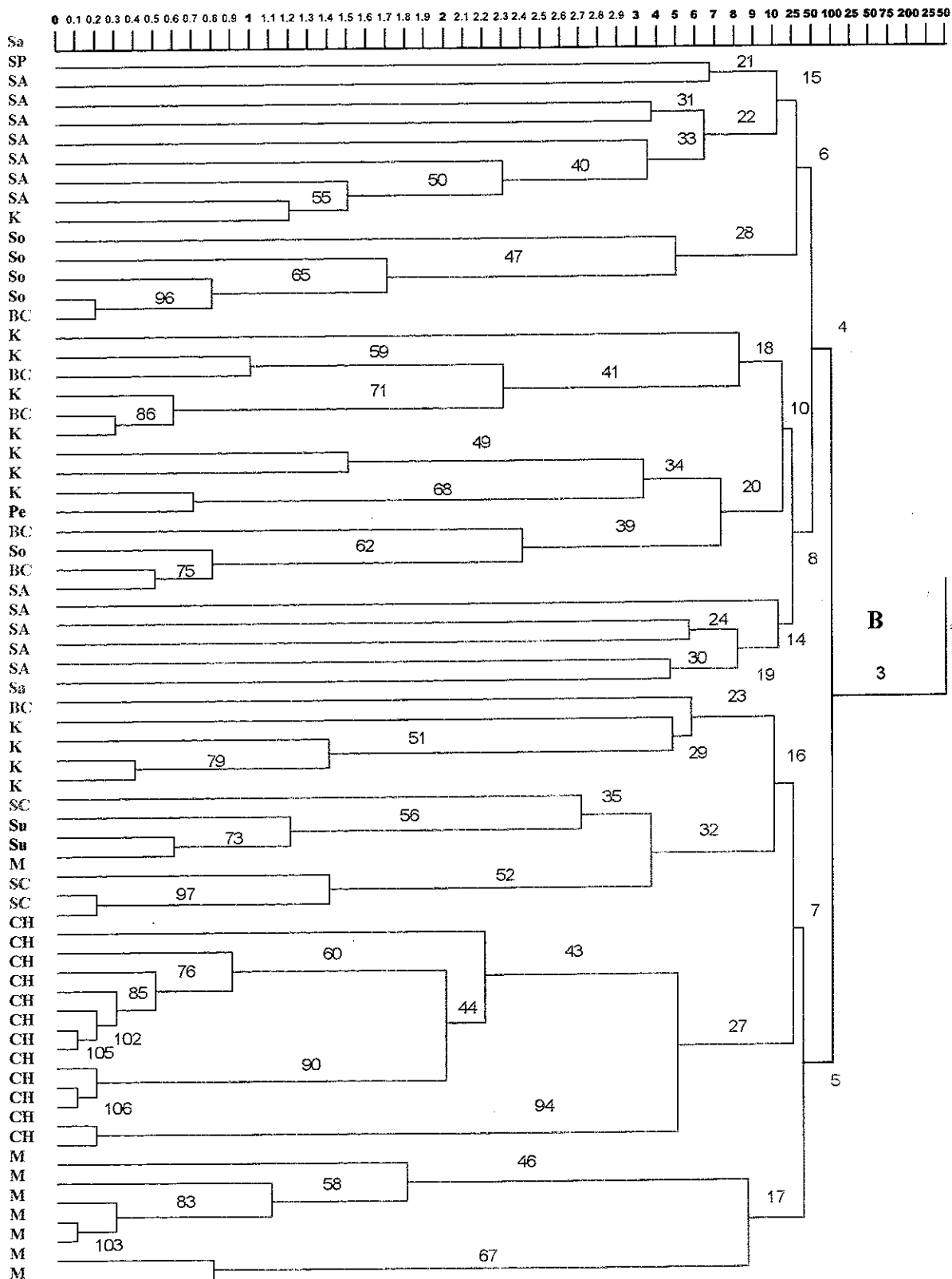
El sub-grupo B1 incluye individuos principalmente de la Chachalaca, Matapalo y otros de diversos sitios. El subgrupo B2 está formado por genotipos de San Antonio, Kéköldi, Parque Soberanía, Barro Colorado y algunos de El Salado. La agrupación de los materiales de este grupo indica una relación entre los individuos provenientes de áreas con influencia del Atlántico. Se establece una estrecha relación entre los genotipos de Kéköldi y los provenientes de Barro Colorado y Parque Soberanía en Panamá.



Chi: Chirilagua (El Salvador), M: Matapalo (Aguirre, Costa Rica), SC: Santa Cecilia (La Cruz, C. R.),
Su: Surtubal (Turubares, C. R.), P: La Pacifica (Cañas, C. R.)

— = Grupo 1
— = Grupo 2

FIGURA 8 . Fenograma obtenido por el agrupamiento jerárquico de Ward de *Quassia amara* basado en distancias de Gower (1967).



Sa: El Salado (Honduras), SP: San Pablo (Turubares, C.R.), K: Kéköldi (Talamanca, C.R.), So: Parque Soberanía (Panamá), BC: Barro Colorado (Panamá), SA: San Antonio (Guatemala), Su: Surtubal (Turubares, CR), SC: Santa Cecilia (La Cruz), CH: La Chachalaca (San Carlos, C.R.), M: Matapalo (Aguirre, C.R.)

_____ = Grupo 3 _____ = Grupo 4

CONTINUACION: FIGURA 8.

4.1.5. Valor discriminante de los caracteres para separar grupos

4.1.5.1. Caracteres cualitativos

Se analizaron los caracteres cualitativos correspondientes a hoja, debido a que no se obtuvo suficientes datos para los caracteres de los otros órganos de la especie en estudio.

En el Cuadro 4 se presentan los estados de los descriptores evaluados en esta fase y en el Cuadro 5 los que presentaron mayor frecuencia y mayor porcentaje en la hoja. Puede observarse que en La Pacífica, La Chachalaca y Surtubal, el 100 por ciento de las hojas evaluadas presentaron la misma coloración, en tanto que en los otros sitios se encontró toda una gama de coloraciones.

CUADRO 4. Estados de los descriptores cualitativos seleccionados para hoja en la caracterización de *Q. amara*.

Color del haz del foliolo terminal		Color del envés del foliolo terminal		Color del punto de inserción del peciolo terminal	
Color	Código	Color	Código	Color	Código
	2.5GY3/4 : 352304		2.5GY6/4 : 352604		5RP3/4 : 102406
	5GY4/4 : 354404		2.5GY3/4 : 354414		5RP3/8 : 104306
	5GY4/6 : 354414		5GY4/4 : 354484:		5RP3/10 : 104326
	5GY5/4 : 354604		5GY5/4 : 354494		5RP4/8104356.
	7.5GY3/2 : 354806		5GY6/4 : 354504		5RP5/10 : 104367
	7.5GY3/4 : 355734		5GY6/8 : 354514		2.5R4/4 : 104386
	7.5GY 4/2 : 356304		5GY3/4 : 354604		2.5R4/6 : 104465
	7.5GY4/4 : 356314		7.5GY4/4 : 356304		5R4/8 : 102466
	7.5GY4/6 : 356353		7.5GY4/6 : 56354:		5R5/4 : 104526
	356404 : 2.5G4/2		7.5GY5/4 : 356406:		5R5/6 : 104848
	2.5GY5/4 : 356406		7.5GY6/4:356426		5R5/8 : 105175
	5GY5/4 : 3611332 .		7.5GY6/8 : 356504		5R6/4 : 105536
			7.5GY3/10 : 356604:		5R6/6 : 105986
			7.5GY4/8 : 356608:		5R3/4 : 107106
					5R3/6 : 108306

CUADRO 5. Características cualitativas de hoja por sitio con mayor frecuencia y porcentaje en poblaciones silvestres de *Quassia amara*.

Sitio	Característica	Estado	Frecuencia	%
San Antonio	Color del haz del foliolo terminal	5G4/2	91	75.8
	Color del envés del foliolo terminal	5GY5/4	108	90.0
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5R4/6	25	20.8
El Salado	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY4/6	72	60.0
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY6/8	100	83.0
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/8	91	75.8
Kéköldi	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	77	65.8
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY5/4	80	68.4
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	2.5R4/6	40	34.2
La Pacífica	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	119	100
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY4/6	119	100
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/10	119	100
La Chachalaca	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	120	100
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY4/6	120	100
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5R4/6	90	75.0
Matapalo (M)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	90	75.0
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY5/4	70	58.3
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/8	50	41.7
Santa Cecilia (SC)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	110	100
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY4/6	110	100
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/10	110	100
Surtubal (Su)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	40	100
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY4/6	40	100
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/10	40	100
Parque Soberanía (So)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	34	77.3
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY6/4	34	77.3
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	2.5R4/4	34	77.3
Barro Colorado (BC)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	39	66.1
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY5/4	49	83.1
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP4/8	29	49.2
Chirilagua (Chi)	Color del haz del foliolo terminal	7.5GY3/4	90	75.0
	Color del envés del foliolo terminal	7.5GY4/6	90	75.0
	Color del punto de inserción del foliolo terminal	5RP3/10	90	75.0

En la caracterización morfológica de hoja, tres caracteres cualitativos fueron evaluados, los cuales presentaron alta significancia ($p < 0.05$) en la separación de los grupos, aunque al hacer las observaciones en el campo no es posible diferenciar las poblaciones de los diferentes sitios, tomando estas características. En el Cuadro 6 se observa que la característica de color del punto de inserción del foliolo terminal, tiene el mayor valor de χ^2 (203,82, $\alpha = 95\%$), indicando que entre las tres variables cualitativas para hoja, fue ésta la variable que más aportó para la separación de los grupos, aunque esto no fue evidente en las observaciones en el campo, ya que esta coloración se encuentra muy marcada cuando las hojas son muy jóvenes pero se pierde cuando las hojas van madurando.

Cuadro 6. Análisis de los caracteres cualitativos de la hoja de *Quassia amara*.

CARÁCTER	χ^2	COEFIC. Phi	CRAMER (V)	α 95%
Color punto inserción foliolo terminal	203,82	1,33	0,78	0,001
Color del envés del foliolo terminal	191,85	1,31	0,76	0,001
Color del haz del foliolo terminal	143,04	1,13	0,65	0,001

La característica que más discriminó fue el color del punto de inserción del foliolo terminal con un nivel de confianza del 95%. Aunque esto no es evidente en el campo, pues esta coloración se encuentra muy marcada cuando las hojas son muy jóvenes perdiéndose cuando llegan a adultas.

4.1.5.2. Caracteres cuantitativos

En el Cuadro 7 se observan los descriptores cuantitativos con mayor valor discriminante, observándose que las características "longitud de los foliolos" y las variables generadas a partir de longitud y ancho son los que permiten diferenciar entre los grupos.

CUADRO 6. Promedio, valor discriminante "D" y "Dw" para los caracteres cuantitativos de hojas, en el agrupamiento de individuos de *Quassia amara*.

DESCRIPTORES	G1 PROM±DE	G2 PROM±DE	G3 PROM±DE	G4 PROM±DE	VALOR "D"	VALOR "Dw"
Longitud de la hoja	254.4±30.7	230.5±20.3	305.3±20.3	295.9±26.1	0.8333	0.8333
Longitud peciolo de la hoja	74.3±8.0	71.1±5.6	87.4±7.6	91.4±10.3	0.3333	0.21789
Longitud del raquis de la hoja	57.9±6.5	53.5±4.5	65.1±4.8	66.3±6.3	0.8333	0.79394
Longitud del foliolo terminal	120.7±16.8	105.5±12.7	152.8±11.5	137.9±15.5	1.0	1.0
Ancho del foliolo terminal	41.4±5.9	36.5±5.3	51.2±3.5	49.5±6.3	0.8333	0.11212
Longitud del foliolo izquierdo 1	107.4±10.1	95.5±11	132.0±7.5	120.5±12.4	1.0	1.0
Ancho del foliolo izquierdo 1	37.8±5.0	33.4±4.9	45.4±3.0	44.0±5.5	0.8333	0.82989
Angulo de inserción foliolo izquierdo 1	131.6±4.5	133.4±6.4	130.5±4.9	129.2±4.5	0.1666	0.83008
Longitud del foliolo izquierdo 2	106.3±11.6	92.5±12.3	132.9±9.4	115.2±10.0	1.0	1.0
Ancho del foliolo izquierdo 2	39.1±4.2	33.7±5.3	47.2±3.2	45.5±4.9	0.8333	0.44445
Angulo de inserción del foliolo izquierdo 2	127.7±5.0	130.7±6.3	126.5±5.8	124.3±6.5	0.1666	0.79795
Longitud X ancho del foliolo terminal	5074.3±1346	3902.5±998.9	7831.1±864.8	6922.25±1717.5	1.0	1.0
Longitud / ancho del foliolo terminal	2.9±0.3	2.9±0.2	3.0±0.3	2.8±0.1	0.3333	0.83101
Longitud X ancho del foliolo izquierdo 1	4102.4±856.1	3237.6±802.5	6003.8±635.9	5360.6±1246.0	1.0	1.0
Longitud / ancho del foliolo izquierdo 1	2.9±0.2	2.9±0.2	2.9±0.2	2.8±0.1	0.5	0.83146
Longitud X ancho del foliolo izquierdo 2	4184.2±803.3	3164.5±869.1	6287.7±706.8	5286.8±1011.83	1.0	1.0
Longitud/ancho del foliolo izquierdo 2	2.7±0.2	2.77±0.2	2.8±0.2	2.5±0.11	0.5	0.83329
Ancho de la hoja	158.0±14.1	134.1±23.4	189.3±20.3	180.4±20.9	0.8333	0.83159
Longitud X ancho de la hoja	40454.6±7541.6	31244±7926.1	57930.6±7434.3	53657.8±10198.8	0.8333	0.030092
Longitud/ ancho de la hoja	1.6±0.2	1.7±0.2	1.6±0.1	1.6±0.1	0.8333	0.83122

Se encontró que seis características son las más discriminantes, con valor de uno (1,0), es decir que son muy diferentes entre los individuos en estudio. Estos fueron longitud del foliolo terminal, longitud del foliolo izquierdo 1, longitud del foliolo izquierdo 2, LxA del foliolo terminal, LxA del foliolo izquierdo 1 y LxA del foliolo izquierdo 2. Dentro de los caracteres cuantitativos para recalculer los valores de "D", la longitud de la hoja se consideró como primer carácter con mayor poder discriminante (0,8333) para separar los grupos. Una vez recalculados los $D'w=Dw(1-r^2)$ sobre la base del carácter con mayor valor discriminante (0,8333), la relación L/A del foliolo izquierdo 2 se eligió como el segundo carácter con mayor poder discriminante (0,83329), seguido de ancho de la hoja, L/A foliolo izquierdo 1, L/A foliolo terminal, con valores de 0,83159; 0,83146 y 0,83101 respectivamente.

Las características que menos aportaron a la formación de grupos fueron LxA de la hoja (0,03009), ancho del foliolo terminal (0,11212), longitud del peciolo de la hoja (0,21789) y ancho del foliolo izquierdo 2 (0,44445).

Las características con menor valor discriminante fueron: la relación LxA de la hoja (0,030092) y ancho del foliolo terminal (0,11212).

Al considerar la longitud de la hoja como la característica con el más alto valor discriminante para calcular el "Dws" recalculados, se puede decir que a nivel de campo, esta no es una característica que identifique poblaciones, porque es posible encontrar en una misma planta, hojas muy pequeñas y hojas muy grandes. Según lo observado, las hojas producidas después de la floración y fructificación eran más grandes.

4.1.5.3. Análisis discriminante canónico

En el análisis discriminante canónico, la variable con mayor valor discriminante es la relación LxA del foliolo izquierdo 2 (0,9), le siguen en orden descendente, longitud del foliolo izquierdo 1 (0,89), LxA de hoja (0,884), ancho del foliolo izquierdo 2 (0,869), largo del foliolo izquierdo 2 (0,865), longitud de la hoja (0,859), longitud del foliolo terminal.

Tapia (1998) encontró que la relación L/A de la raíz de *Pachirrizus tuberosus* era el carácter con mayor valor discriminante. La Figura 9 representa la ubicación espacial de los individuos de acuerdo a las ecuaciones construidas a partir del coeficiente de Gower (1967) mediante el análisis discriminante canónico. La variable canónica CAN 1 explica el 62% de la variabilidad total mientras que la variable canónica 2 explica el 24% de la variabilidad (Cuadro 8). Puede observarse que existe combinación de individuos de los diferentes grupos, lo que indica que comparten características entre sí.

Cuadro 8. Variables canónicas CAN1 y CAN2 de la separación de grupos en la caracterización morfológica de *Quassia amara*.

CAN1	CAN2
LxA foliolo izquierdo 2 (0,9)	L/A del foliolo izquierdo 2 (0,624)
Longitud del foliolo izquierdo 1 (0,89)	
LxA de la hoja (0,884)	
Ancho del foliolo izquierdo 2 ((0,869)	
Longitud del foliolo terminal (0,858)	

En los materiales silvestres de *Q. amara*, no fue posible obtener una clasificación marcada de materiales con base en las características morfológicas. Será necesario evaluar otras características de flor, fruto y semilla para detectar descriptores que permitan separar los grupos.

El hecho de no haber encontrado grupos perfectamente definidos con sus características propias ya sea por condiciones climáticas, geográficas, sitio de origen y dispersión, apoya la opinión de Porter, 1972 y Brown, 1995 de que es difícil determinar claramente cual es la distribución natural de *Q. amara*, porque ha sido cultivada en muchas regiones indígenas por sus propiedades y usos.

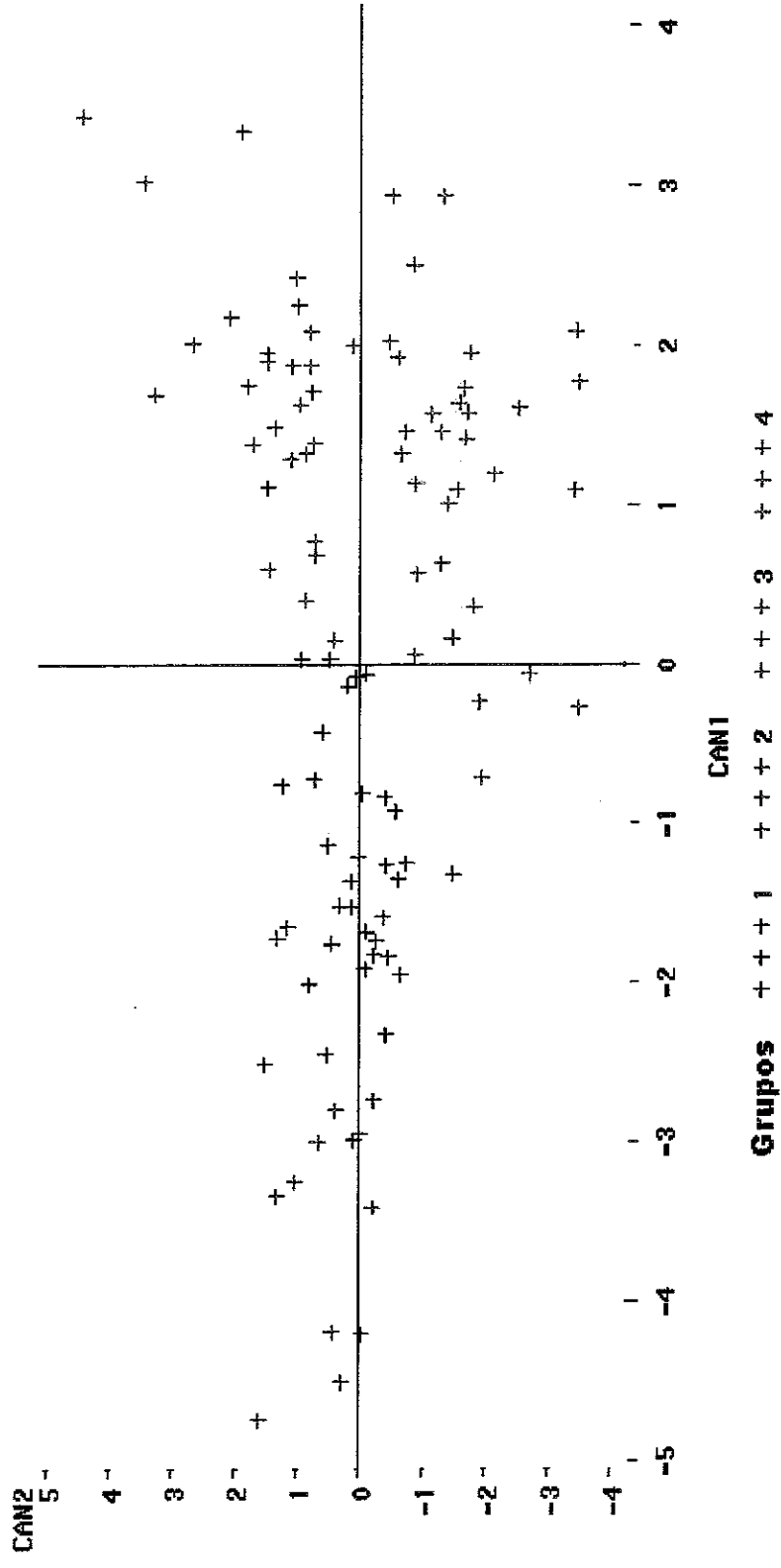


FIGURA 9. Distribución de los arbutos de *Quassia amara* en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower.

4.1.6. Tamaño de muestra

4.1.6.1. Hoja

En el Cuadro 9 se presenta el número de plantas por sitio para la evaluación de características cuantitativas de hoja.

Con un nivel de confianza del 90% es posible evaluar las poblaciones silvestres de *Q. amara* tomando datos de cinco plantas por sitio de muestreo con el 90% de confianza, ampliando el rango hasta el 95%, se recomienda evaluar 19 arbustos por sitio.

Cuadro 9. Número de plantas por sitio de muestreo para la caracterización morfológica de poblaciones silvestres de *Quassia amara*.

CARACTERÍSTICA	NIVEL DE CONFIANZA	
	90%	95%
Longitud del foliolo terminal	5	19
Longitud del foliolo izquierdo 1	4	15
Longitud del foliolo izquierdo 2	4	16
Longitud de la hoja	4	13
Ancho del foliolo terminal	7	27
Ancho del foliolo izquierdo 1	7	27
Angulo de inserción del foliolo 1	1	3
Ancho del foliolo izquierdo 2	6	24
Angulo de inserción del foliolo 2	1	3
Ancho de la hoja	6	24
Longitud del peciolo	4	14
Longitud del raquis	4	13

En el Cuadro 10 se presentan las características cuantitativas y el tamaño de muestra para número de hojas por arbusto por sitio. Se encontró que con un nivel de confianza del 90%, el número de hojas por planta a muestrear es de dos; con el 95% de confianza, el número adecuado es de 8 hojas por arbusto.

Cuadro 10. Número de hojas por arbusto por sitio para la caracterización de *Q. amara*. 95%

CARACTERÍSTICA	Número de hojas por arbusto	
	90%	95%
Longitud del foliolo terminal	2	8
Longitud del foliolo izquierdo 1	3	12
Longitud del foliolo izquierdo 2	3	12
Longitud de la hoja	3	10
Ancho del foliolo terminal	2	8
Ancho del foliolo izquierdo 1	3	12
Angulo de inserción del foliolo 1	4	12
Ancho del foliolo izquierdo 2	3	12
Angulo de inserción del foliolo 2	4	12
Ancho de la hoja	3	12
Longitud del peciolo	3	11
Longitud del raquis	3	10

4.1.6.2. Flor

En el Cuadro 11 se muestra el número de flores por planta para la evaluación de flores por planta por sitio en poblaciones de *Q. amara*. Se obtuvo que el número de flores por arbusto es de tres, con el 90% de confianza y doce flores por arbusto para un 95 % de confianza.

Cuadro 11. Número de flores por planta por sitio para la caracterización de poblaciones silvestres de *Q. amara*

CARACTERÍSTICA	Número de flores por arbusto	
	90%	95%
Longitud del pedicelo	3	12
Ancho de la base de la corola	3	12
Longitud del pétalo	2	8
Ancho del pétalo	3	10
Longitud de los estambres	2	7
Longitud del gineceo	3	6

4.1.6.3. Fruto

En el Cuadro 12 se presenta el número de frutos por arbusto. Con el 90% de confianza, se recomienda evaluar 4 frutos y con el 95% de confianza, 12.

Cuadro 12. Número de frutos por planta por sitio para la caracterización de poblaciones silvestres de *Q. amara*

CARACTERÍSTICA	Número de frutos por arbusto	Número de frutos por arbusto
Longitud del eje central	3	12
Forma de la base	3	12
Forma de imbricación de la drupa	3	12
Longitud de la drupa	4	8
Ancho de la drupa	3	12

4.1.6.4. Semilla

En el Cuadro 13 se muestra el número de semillas para la caracterización morfológica de poblaciones silvestres de *Q. amara*. Con un nivel de confianza del 90% se recomienda evaluar seis semillas; con el 95%, 21.

Cuadro 13. Número de semillas por arbusto y número de arbustos por sitio, para la caracterización de poblaciones silvestres de *Q. amara*.

CARACTERÍSTICA	Número de semillas por arbusto	
	90%	95%
Longitud de la semilla	6	21
Ancho de la semilla	3	12

De acuerdo a los resultados en la determinación del tamaño de muestra, con un nivel de confianza del 90% se necesitan cinco arbustos por sitio y tres hojas, tres flores, tres frutos y seis semillas, según las características evaluadas. Para un 95% de nivel de confianza, se recomienda evaluar 19 arbustos con ocho hojas, 12 flores, 12 frutos y 21 semillas.

4.2 FASE DE LABORATORIO

4.2.1. Extracciones de ADN

Para el aislamiento del ADN se utilizó el método CTAB-minipreparaciones (Doyle y Doyle, 1987), por cuanto había sido identificado por Upegui (1998) como el más eficiente para las extracciones en *Q. amara*. Este método además, tiene la ventaja de obtener en forma rápida y sencilla, altos rendimientos de ADN, partiendo de cantidades pequeñas de material vegetal. El procedimiento se puede realizar en un solo día y es eficiente en una gran cantidad de organismos. En el CATIE se ha usado con éxito en la extracción de jícama (*Pachyrhizus spp.*), caoba (*Swietenia spp.*), café (*Coffea spp.*), insectos adultos, larvas, etc.

Con ese método se obtuvo suficiente ADN de los genotipos provenientes de La Chachalaca, Matapalo, Canalete, Santa Cecilia, San Emilio, Kéköldi, Surtubal, Turrubares, Barro Colorado y Soberanía. En todos estos casos se usó hojas jóvenes congeladas, pues se determinó experimentalmente, que se obtenía un resultado similar usando hojas congeladas como frescas.

Se encontró que en el caso de los genotipos de San Antonio, Chirilagua, La Lupe, El Salado, Buenos Aires, Penonomé y La Pacífica, a pesar de que se utilizó un procedimiento idéntico, el rendimiento de ADN obtenido fue muy bajo o nulo en algunos experimentos. Esto confirma lo observado en el laboratorio de biología molecular del CATIE, en el sentido de que dentro de una determinada especie de planta, existen genotipos que tienen dificultades con el método de extracción que es eficiente para el resto. También se da el caso de que un método de extracción que es eficiente para muchos organismos, no funciona para una especie determinada. Tal es el caso de CTAB-minipreparaciones en cacao. En ambas situaciones el problema se podría originar por la presencia de ciertas sustancias que inhiben el funcionamiento o reaccionan con alguno de los reactivos usados en la extracción.

Para los genotipos que mostraron problemas en las extracciones se siguieron tres estrategias: evaluar otros métodos de extracción, evaluar diferentes pH del buffer de extracción y variar la edad de las hojas usadas.

a) Evaluación de métodos de extracción. Se obtuvieron los siguientes resultados:

I. **Método de extracción para cacao** (utilizado en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología) se usó para los genotipos de El Salado, Penonomé y Turrubares. Se incluyeron dos genotipos testigo (cacao y caoba). No se logró obtener ADN excepto para los testigos. Esto coincide con lo obtenido por Upegui (1998), al hacer extracciones a partir de material proveniente de Kéköldi.

II. **Método del Xantogenato:** se evaluó para un genotipo de El Salvador, pero no se logró aislar ADN. Con este método Upegui (1998), obtuvo un máximo de 53 ng/ml usando hojas jóvenes congeladas provenientes de Kéköldi.

b) Variación del pH del buffer de extracción. Normalmente el pH del buffer de extracción en el método CTAB no se regula, pues se estima que está cercano a 8,0. Para eliminar cualquier posible efecto de este factor sobre el éxito en las extracciones, se evaluaron tres pH diferentes (7,5; 8,0 y 8,5) con algunos de los genotipos de difícil extracción, como son: Penonomé, Turrubares y La Chachalaca. Con el pH 8,5 se obtuvo un leve incremento en el rendimiento de ADN. Upegui (1998) al evaluar esos mismos valores de pH, encontró que tampoco había un efecto significativo sobre el rendimiento del ADN obtenido.

c) Edad de la hoja. Cuando se utilizaron hojas de edad intermedia en los genotipos de La Chachalaca, Penonomé y Chirilagua, se obtuvo mayor rendimiento de ADN en comparación con el uso de hojas jóvenes. Este resultado es contrario a lo observado por Upegui (1998), quien encontró que la mejor edad para las extracciones era cuando las hojas jóvenes. La disimilitud en estos resultados puede deberse a que la edad ideal de la hoja depende del genotipo usado.

Con base en los resultados anteriores, se decidió finalmente que para aquellos genotipos que tenían dificultad para extraerles el ADN, se continuaría usando el método CTAB-minipreparaciones con hojas de edad intermedia. Se fue acumulando entonces el ADN obtenido en sucesivas extracciones, hasta que se alcanzó una cantidad que se consideró aceptable. Una vez que se completó este proceso, se estimó la cantidad de ADN para todos

los genotipos. Se obtuvo que para la mayoría de los genotipos la concentración fue cercana a los 100 ng/ μ l.

4.2.2. Caracterización molecular

Se analizaron 503 *primers*, de los cuales 72 presentaron buena amplificación y de éstos el 17% mostró bandas polimórficas. En el Cuadro 14 se indican estos "*primers*", la secuencia de nucleótidos que los conforman, la concentración a la cual fueron usados y el número de bandas polimórficas obtenidas con ellos.

La concentración del *primer* en el volumen final de reacción, fue en todos los casos de 1,0 μ M excepto para el UBC 173, en el que se usó una concentración de 0,7 μ M, después de determinarse experimentalmente que amplificaba mejor a esta concentración.

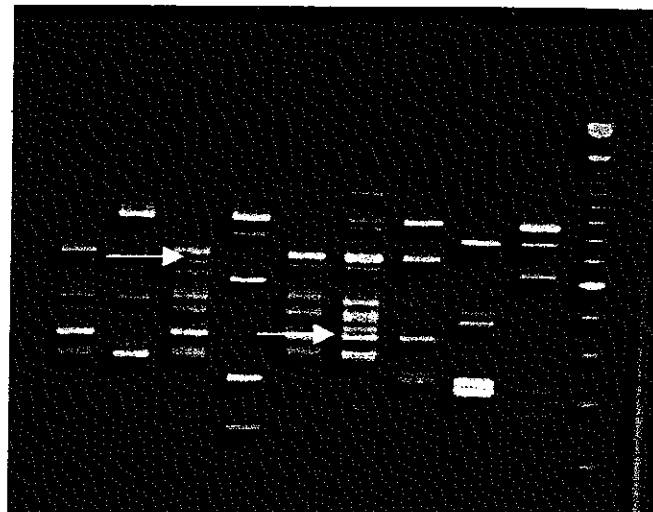
El número de bandas polimórficas detectadas, por "*primer*", estuvo entre una (UBC-220 y OPC-19) y once (UBC-284 y OPE-15). Algunos "*primers*", como el N-20, I-7, L-18, X-9, X 16, J-19, a pesar de su buena amplificación y presencia de varias bandas, no mostraron ninguna banda polimórfica. En las Figuras 10 y 11, se presentan ejemplos de las amplificaciones obtenidas con dos de los "*primers*" polimórficos.

A partir de los "*primers*" seleccionados se generaron 142 bandas polimórficas. Después de determinar que 13 de estas bandas repetían información, se procedió a eliminarlas, realizando la caracterización de los 19 genotipos de *Q. amara* con sólo 129 bandas. Esta eliminación era necesaria para poder aplicar el programa de computo *PopGene*, para el análisis de los datos moleculares.

4.2.3. Definición de grupos genéticos

En el dendograma UPGMA obtenido con el paquete computacional Popgene (Yeh *et al.* 1996) de la Figura 12 se muestra la clasificación obtenida para los 19 genotipos de *Q. amara* evaluados en la presente investigación. Se puede observar que los genotipos se agregan en dos grandes grupos C y D.

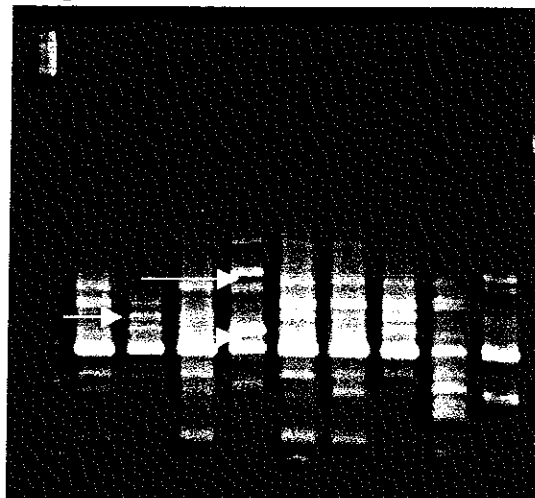
SE BA Ca Su So BC Pe Chi Chi 123pb



SE: San Emilio; BA: Buenos Aires; Ca: Canaete; Su: Surtubal; So: Soberanía; BC: Barro Colorado; Pe: Penonomé; Chi: Chirilagua.
Escala de 123 pb
→: Polimorfismos.

FIGURA 10. Ejemplo de una amplificación de ADN y polimorfismos de los genotipos de *Quassia amara* con la técnica RAPDs y el "primer" OPB-06; .0 μ M

123pb SE BA Ca Su So BC Pe Chi Chi



SE: San Emilio; BA: Buenos Aires; Ca: Canaete; Su: Surtubal; So: Soberanía; BC: Barro Colorado; Pe: Penonomé; Chi: Chirilagua. Escala de 123 pb
→: Polimorfismos.

FIGURA 11. Ejemplo de una amplificación de ADN de *Quassia amara* con la técnica RAPDs y el "primer". OPE 01; 0,1 μ M.

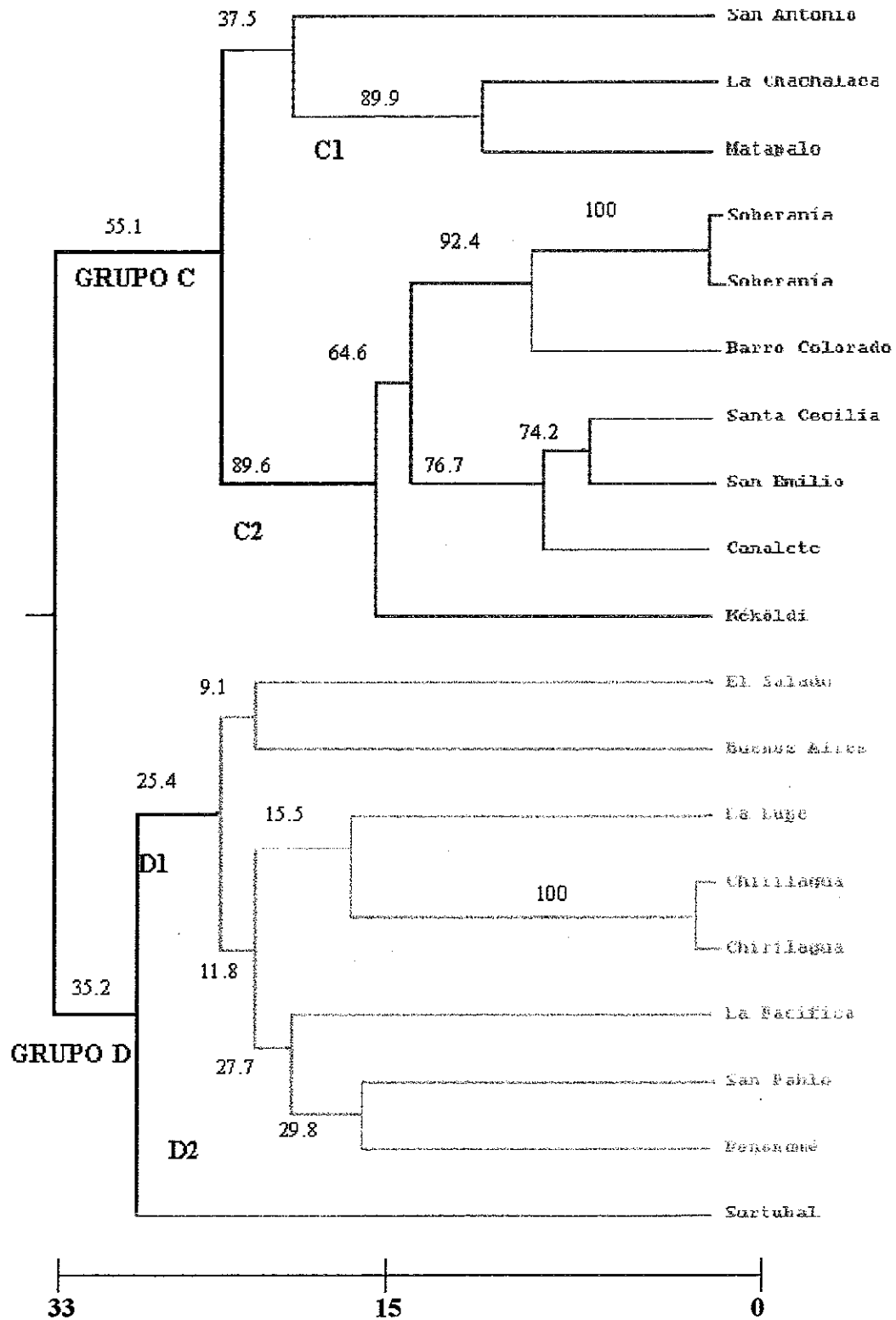


FIGURA 12. UPGMA dendrograma y bootstrap (2000 repeticiones) de el agrupamiento de genotipos de *Q. amara* provenientes de Centroamérica, según la matriz de distancia y similitud de Nei (1979).

CUADRO 14. Lista de "primers" polimórficos identificados para la caracterización molecular de *Q. amara*, utilizando marcadores RAPDs.

PRIMER	SECUENCIA	CONCENTRACION (μ M)	No. DE BANDAS POLIMORFICAS
1. UBC-173	CAG GCG GCT T	0,7	3
2. UBC-220	GTC GAT GTC G	1,0	1
3. UBC-272	AGC GGG CCA A	1,0	2
4. UBC-283	CGG CCA CCG T	1,0	6
5. UBC-284	CAG GCG CAC A	1,0	11
6. OPB-06	TGC TCT GCCC C	1,0	10
7. OPC-01	TTC GAG CCA G	1,0	3
8. OPC-06	GAA CGG ACT C	1,0	8
9. OPC-11	AAA GCT GCG G	1,0	2
10. OPC-18	TGA GTG GGT G	1,0	6
11. OPC-19	GTT GCC AGC C	1,0	1
12. OPD-13	GGG GTG ACG A	1,0	3
13. OPD-18	GAG AGC CAA C	1,0	4
14. OPE-01	CCC AAG GTC C	1,0	7
15. OPE-02	GGT GCG GGA A	1,0	7
16. OPE-14	TGC GGC TGA G	1,0	3
17. OPE-15	ACG CAC AAC C	1,0	11
18. OPE-16	GGT GAC TGT G	1,0	4
19. OPE-18	GGA CTG CAG A	1,0	8
20. OPE-19	ACG GCG TAT G	1,0	9
21. OPE-20	AAC GGT GAC C	1,0	7
22. OPF-06	GGG AAT TCG G	1,0	6
23. OPH-13	GAC GCC ACA C	1,0	7

129

Grupo C: Formado por los materiales de San Antonio (Guatemala), La Chachalaca (Bocas de San Carlos, C.R.) y Matapalo (Aguirre, C.R.), los cuales conforman a su vez lo que podría llamarse sub-grupo C1, y por los genotipos de Parque Soberanía (Panamá), Barro Colorado (Panamá), Santa Cecilia (La Cruz, C.R.), San Emilio (Los Chiles, C.R.), Canalete (Upala, C.R.) y Kéköldi (Talamanca, C.R.), los cuales conformarían el sub-grupo C2.

Grupo D: Aquí aparecen los genotipos de El Salado (Honduras), Buenos Aires (Osa, C.R.), La Lupe (Nicaragua), Chirilagua (El Salvador), La Pacífica (Cañas, C.R.), San Pablo (Turrubares, C. R.), los cuales conforman el subgrupo D1, y el material de Surtubal (Turrubares) que conformaría el subgrupo D2.

Como puede ser apreciado también en la Figura 12, los dos genotipos que se usaron como testigos (Soberanía y Chirilagua) se agruparon en forma idéntica a su similar, lo que confirma que las condiciones experimentales fueron adecuadas.

De acuerdo con los resultados anteriores, no se encontró un patrón que relacione en forma definitiva, la afinidad genética de los genotipos evaluados, con la posición geográfica de la cual proceden (Figura 1). Esto confirma lo indicado por Porter (1972) y Brown (1995), en el sentido de que es difícil determinar claramente cual es la distribución natural de *Q. amara*. Esto por cuanto la especie ha sido utilizada como medicamento desde tiempos inmemoriales y en muy diferentes regiones del continente americano. Es posible que desde estas épocas, se haya dado en el continente americano, un trasiego importante de la planta, con el objeto de tener al alcance de los indígenas, el remedio para los momentos inciertos en que se requiriera su uso.

Esto no quiere decir que no pueda existir sitios en los cuales la planta ha permanecido al estado silvestre por mucho tiempo desarrollando tipos genéticos particulares. Sería de interés entonces, tratar de descifrar un poco el comportamiento de aquellos genotipos que podrían estar en esa situación. Este es el caso de poblaciones como las de Barro Colorado en Panamá, Kéköldi en Costa Rica, etc.

En el agrupamiento mostrado en la Figura 13 se puede concluir que el grupo C está principalmente conformado por genotipos representativos de la zona Atlántica y de la zona norte de Costa Rica, regiones que se caracterizan por condiciones de alta precipitación y porque no existe una estación seca marcada. Por su parte, el grupo D está formado por materiales provenientes de la costa Pacífica de Centroamérica, con precipitaciones más reducidas y una estación seca marcada.

Al analizar con más detalle el sub-grupo C2, se observa que los genotipos de Soberanía y Barro Colorado, ambos de Panamá, guardan una estrecha relación genética con el genotipo de Kéköldi, el cual tiene su origen en el área de Talamanca, Costa Rica. No es de extrañar esta afinidad considerando la relativa cercanía que tienen estos materiales, y el hecho de que en los tres casos se trata de poblaciones silvestres cuyo origen es muy antiguo (Brown, 1995).

También existe gran relación genética entre esos tres materiales y aquellos procedentes de la zona norte de Costa Rica fronteriza con Nicaragua, como son: Santa Cecilia, en la Cruz, San Emilio en Los Chiles y Canalete en Upala. A pesar de que las condiciones ambientales en estos sitios se asemejan a las de la zona Atlántica, en este caso no se podría desechar la posibilidad de que dichos genotipos hayan sido introducidos en el pasado a estas áreas, desde el Atlántico.

Por otra parte, es interesante observar que los genotipos panameños mencionados no guardan una relación genética estrecha con el otro material proveniente de ese país, como es el de Penonomé, el cual proviene de una zona afectada por el clima pacífico.

La situación del Sub-grupo C1 es más confusa pues está conformado por un genotipo de Guatemala, el cual aparentemente no es autóctono sino que fue introducido al país no hace muchos años, por un genotipo obtenido cerca del Río San Juan en la zona norte de Costa Rica limítrofe con Nicaragua por lo que debería formar parte del sub-grupo C2, y por un genotipo de Matapalo, población ubicada en Dominical, Pacífico Central de Costa Rica, y que sería por lo tanto más afín con el Grupo D. Este comportamiento se podría explicar como el producto de la introducción de material procedente de otras áreas, o incluso se podría pensar en posibles hibridaciones entre materiales con diferente origen.

En el sub-grupo D1 se agrupan en general, los genotipos del Norte de Centroamérica, como son El Salado (Honduras), Chirilagua (El Salvador) y La Lupe (Nicaragua). También forman parte de este grupo otros genotipos afectados por las condiciones pacíficas como son: Buenos Aires, La Pacífica y San Pablo de Turrubares (Costa Rica) y Penonomé

(Panamá). El Grupo D2 está conformado por un único genotipo proveniente de Surtubal. En este caso se trata de una población relativamente joven, por lo que probablemente fue introducida a la zona desde un sitio desconocido, por lo que es difícil sacar conclusiones sobre su origen. Es importante resaltar el hecho de que el genotipo de El Salado (Honduras) proviene de un área con influencia Atlántica.

Podría concluirse que en la agrupación de los genotipos centroamericanos de *Q. amara*, están coincidiendo dos factores en forma simultánea: por un lado se da una separación de los mismos según el origen Pacífico o Atlántico que tengan, y por otra parte, se da la influencia de dos posibles acervos genéticos dentro de la población, uno procedente del norte y representada por las poblaciones de El Salado (Honduras), Chirilagua (El Salvador) y La Lupe (Nicaragua), y otro conformado por poblaciones representadas típicamente por Barro Colorado, Soberanía (ambos de Panamá) y Kéköldi (Talamanca, Costa Rica).

En Costa Rica ambos acervos podrían encontrarse mezclados geográficamente, lo que produce confusión al tratar de definir una relación entre la ubicación geográfica y genética de esos genotipos. Desdichadamente y a pesar de los esfuerzos que se hicieron, no se contó en el análisis con material de Sur América y México, ni con más genotipos mesoamericanos, lo cual hubiera podido sustentar mejor esta hipótesis. Se recomienda ampliar en futuras investigaciones los materiales evaluados para poder dilucidar mejor este aspecto.

La presencia de dos acervos genéticos en América ha sido encontrada también en otras especies de plantas, como por ejemplo en caoba y en frijol. Vásquez (1998) al estudiar la diversidad genética de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King) de Centroamérica y México, utilizando marcadores RAPDs y variables cuantitativas, encontró que éstas se asociaron en dos grupos básicos, uno conformado por las familias de Panamá y el otro por el resto de las procedencias de Centroamérica y México, lo que sugiere que ambos grupos tienen un origen y/o evolución diferente. Los genotipos de Costa Rica formaron también un grupo que se separó del resto de Centroamérica. A otra escala, en frijol (*Phaseolus vulgaris*), Nienhuis, *et al.* (1992), encontraron una separación de

germoplasma de frijol común en dos grupos de diversidad genéticamente distintos, el de mesoamérica y el grupo andino.

La definición de dos grupos genéticos dentro de la población mesoamericana de *Q. amara*, podría ser de mucha utilidad al momento de emprender un programa de mejoramiento genético de la especie basado en cruzamientos que exploten el vigor híbrido de los materiales.

Mediante el análisis bootstrap se encontró que la agrupación de los genotipos de Chirilagua (El Salvador) con un valor de 100% es una agrupación fuerte o bien conformada, al igual que los genotipos del Parque Soberanía, lo cual es obvio por tratarse del mismo genotipo. Le sigue en orden, con un 92.4% la agrupación de los genotipos de Panamá, con excepción de Penonomé que se agrupa con los materiales del Pacífico. Aunque los brazos que separan a los dos grandes grupos, C y D son bajos (25% y 55 %).

Con base en la información sobre el agrupamiento en cuatro grupos se corrió en Popgen un análisis para determinar qué tan fuertes eran esos agrupamientos. El análisis de los cuatro grupos evaluados como poblaciones, determinó la frecuencia de loci polimórficos por población (Cuadro 13), usando el paquete estadístico Popgene basado en la distancia genética de Nei (1978) con el método UPGMA modificado por Neighbor, con el procedimiento de Philip versión 3.5.

Al analizar las relaciones genéticas entre los grupos formados por los genotipos individualmente, se observa que no hay diferencia ni distancia genética entre los genotipos agrupados en los grupos C1 y D2. Los sitios clasificados como GRUPO C1 son San Antonio, La Chachalaca y Matapalo, el GRUPO C2 Soberanía, Barro Colorado, Santa Cecilia, Canalete, San Emilio y Kéköldi, en el GRUPO D1 se agrupó a El Salado, Buenos Aires, La Lupe, Chirilagua, San Pablo, Penonomé y Surtubal. En el GRUPO D2 se encuentra solamente a Surtubal.

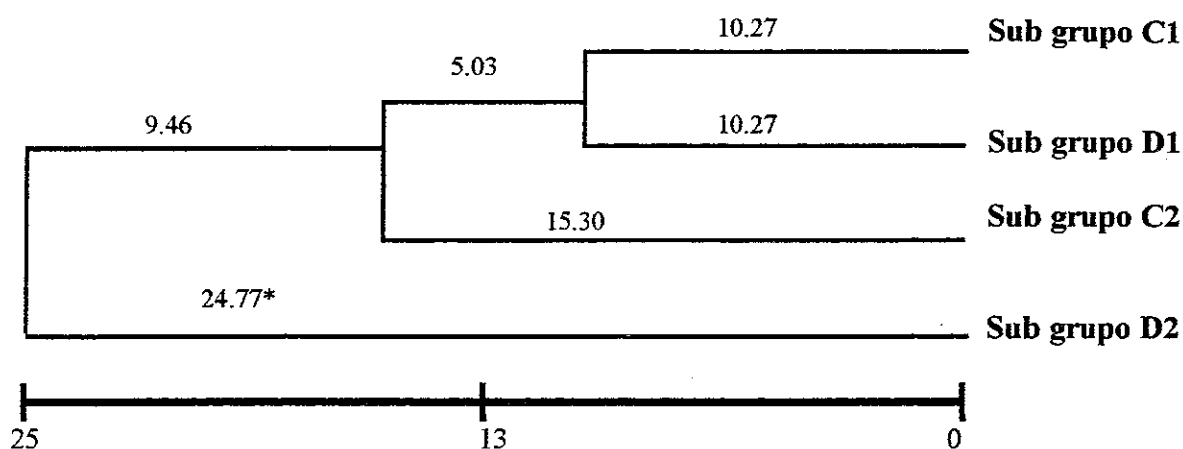


FIGURA 13. Dendrograma UPGMA (1000 replications) de los cuatro grupos de genotipos de *Q. amara*. basado en la Distancia genética de Nei (1978)

En el Cuadro 15 se presenta el número de loci polimórfico y la frecuencia en porcentaje para cada grupo formado.

CUADRO 15. Número de loci polimórficos y frecuencia en porcentaje por grupo de genotipos de *Q. amara*.

GRUPO	Número de loci polimórficos	Frecuencia en %
C1	67	51.9
C2	82	63.6
D1	115	89.1
D2	0	0.0

El mayor número de loci polimórficos se presentó en el grupo D1, con una frecuencia del 89.1%, mientras que el menor número se presentó en el grupo C1. Es importante acotar que en el grupo D2 solamente se agrupa un genotipo (Surtubal, C.R.) por lo que el número de loci polimórficos y la frecuencia es cero (Cuadro 15).

El Cuadro 16 presenta el número de loci polimórficos comunes (debajo de la diagonal) y diferentes (sobre la diagonal) para los grupos formados.

CUADRO 16. Loci polimórficos comunes (debajo diagonal) y loci diferentes (sobre la diagonal) entre agrupaciones de genotipos de *Quassia amara*.

GRUPOS	C1	C2	D1	D2
C1	***	14	27	23
C2	115	***	11	28
D1	102	118	***	3
D2	106	101	126	***

El mayor número de loci polimórficos comunes se presentó entre los grupos D1 (con influencia del Pacífico) y D2 (Surtubal) con 126 loci. Esto reafirma la influencia de la procedencia del Pacífico, porque Surtubal se localiza en el Pacífico, a pesar de encontrarse separado de los demás genotipos, los que comparten menor número de loci son los grupos C2 (con influencia del Atlántico) y D2 (Surtubal) que comparten 101 loci. En cuanto al número de loci diferentes, se encontró que entre los grupos C2 y D2, 28 loci son diferentes y entre los grupos C2 y D1, 11 loci son diferentes.

En el Cuadro 17 se presenta la identidad genética (sobre la diagonal) y la distancia genética (debajo de la diagonal) entre los grupos C1, C2, D1 y D2. Para esto se utilizó el programa estadístico Popgene usando las medidas de identidad y distancias genéticas de Nei (1978).

CUADRO 17. Medidas de distancia genética (debajo de la diagonal) e identidad genética (sobre la diagonal) para los cuatro grupos de la clasificación obtenida para los genotipos de *Quassia amara*.

POBLACION	C1	C2	D1	D2
C1	****	0.7873	0.8142	0.6622
C2	0.2392	***	0.6886	0.5125
D1	0.2055	0.3730	****	0.6665
D2	0.4122	0.6685	0.4058	****

Los grupos C2 con D2 son los más distantes genéticamente (0,66). Los grupos más cercanos son los C1 y D1 (0,20), también A1 con D1 se encuentran genéticamente cerca (0,

23), en estos grupos se encuentran materiales de diferentes procedencias, comprobándose una estrecha variabilidad genética en las poblaciones de esta especie. Esto se explica porque los materiales del grupo C2 tienen influencia del Atlántico, en cambio el genotipo agrupado en D2 tiene influencia del Pacífico.

Según el número de bandas polimórficas obtenidas, el coeficiente de variación de esta evaluación es menor al 10% (Nienhuis, *et al.* 1995). La varianza de la muestra en la estimación de las relaciones genéticas ocurre cuando un sub-grupo al azar de bandas o marcadores no es igual al valor obtenido de todas las posibles bandas. Números altos de bandas al azar proveen una distribución más uniforme y reducen la varianza de estimación de las relaciones genéticas debida a la sobre o sub estimación de ciertas regiones del genoma (Tivang *et al.* 1994).

La base de la diversidad genética es la variación de las secuencias. Los marcadores RAPD muestrean y revelan la variación de las secuencias por la amplificación diferencial de fragmentos de ADN (Nienhuis, *et al.* 1995). Así la diversidad genética dentro de grupos fue de 0.1918 ± 0.0079 . La diversidad genética total promedio fue de 0.3983 ± 0.0106

Según el análisis de diversidad genética de Nei (1987), de las 129 bandas polimórficas, 15 bandas polimórficas aportan mucha información en la conformación de los grupos y 14 no aportan para la caracterización, en el cálculo de la diversidad genética total ($H_t = 0.518$) (Apéndice 7).

La menor distancia genética (0,20) se encontró entre los materiales del sub-grupo C1 (sin zona geográfica definida) y los del Sub-grupo D1, con influencia del Pacífico.

Pruebas de χ^2

En la prueba de χ^2 se procedió a conocer el aporte de cada uno de las 129 bandas polimórficas, en la clasificación para la formación de dos grupos con dos sub-grupos cada uno, 48 de ellas presentan efecto significativo, correspondiendo a los "primers" OPB-06,

OPC-01, OPC-06, OPC-11, OPC-18, OPC-19, OPD-18, OPE-15, OPD-13, OPE-18, OPE-19, OPF-06, OPE-01, OPE-02 OPE-20, OPH-13, UBC-173, UBC-272, UBC-283, UBC-284. En consecuencia 81 bandas no tuvieron mayor aporte en la formación de los grupos.

Se denota cierta relación entre los resultados de los agrupamientos obtenidos en la caracterización morfológica y la caracterización molecular de los genotipos estudiados. En tanto que se vislumbra la existencia de dos acerbos genéticos, uno del Norte de Centroamérica y otro proveniente del Sur, también se puede presumir la estrecha relación entre los materiales provenientes de la costa Pacífica, así como la relación entre los materiales provenientes de la costa Atlántica de Centroamérica.

5. CONCLUSIONES

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA

1. Algunas características morfológicas de la hoja permitieron discriminar entre grupos de genotipos, como son el color del punto de inserción del foliolo terminal, la longitud de los foliolos laterales y terminales y la relación "longitud x ancho" de los foliolos.
2. Las características con menor valor discriminante fueron: la relación Longitud x Ancho de la hoja y el ancho del foliolo terminal.
3. No se encontró una relación definitiva entre la distribución geográfica y la afinidad genética de los materiales evaluados.
4. Los genotipos centroamericanos de *Q. amara* tienden a agruparse en dos grupos: los del Pacífico y los del Atlántico.
5. Se estableció una estrecha relación entre los genotipos de Kéköldi (Talamanca) y los provenientes de Barro Colorado y Parque Soberanía (Panamá).
6. No todas las plantas de una misma procedencia se agruparon en el mismo grupo, lo que denota que existe una segregación importante para las características estudiadas. Esto confirma lo indicado por Porter (1972) y Brown (1995), en el sentido de que es difícil determinar claramente cual es la distribución natural de *Q. amara*, ya que su amplia utilización desde tiempos inmemoriales ha causado que la planta se haya difundido a muchos sitios.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

1. El método CTAB minipreparaciones fue efectivo para la obtención de ADN de *Q. amara*.

2. La metodología RAPDs fue eficaz para lograr la caracterización de los genotipos de *Q. amara* estudiados. Esta metodología permitió obtener 129 marcadores.
3. Al igual que en el análisis morfológico, no se encontró un patrón que relacione en forma definitiva, la afinidad genética de los genotipos evaluados, con la posición geográfica de la cual proceden. Esto se relaciona con la dificultad ya mencionada de distinguir los individuos silvestres de los introducidos por el hombre.
4. A pesar de lo anterior, se observó que los genotipos del Norte de Centroamérica (Honduras, El Salvador y Nicaragua) tendían a agruparse, al igual que los que proceden del sur de esta región, representados principalmente por Barro Colorado y Soberanía en Panamá y Kéköldi en Costa Rica. Esto sugiere la posibilidad de que en la región estén presentes dos acerbos genéticos provenientes del Norte y del Sur del continente.
5. Se observó la tendencia de los genotipos del Atlántico y del Norte de Costa Rica a formar un solo grupo, en contraposición a otro grupo formado por genotipos procedentes del Pacífico, esto puede ser el resultado de su evolución en ambientes diferentes.
6. En Costa Rica ambos acerbos podrían encontrarse mezclados geográficamente, lo que produce confusión al tratar de definir una relación entre la ubicación geográfica y genética de éstos.
7. Por lo general, los resultados de los agrupamientos obtenidos en la caracterización molecular están relacionados con los resultados de la caracterización morfológica de los genotipos.

6. RECOMENDACIONES

1. Completar la caracterización de los materiales en lo que respecta a flores, frutos y semillas, con el objetivo de determinar si existen otros descriptores que los utilizados en el presente estudio, capaces de separar grupos genéticos.
2. Establecer un banco de germoplasma de materiales de *Q. amara* que permita evaluar los materiales en forma genética, fenológica y agronómica bajo condiciones uniformes de clima, suelo y edad de la planta.
3. Intentar definir con mayor profundidad el origen de las poblaciones y el tiempo en que han permanecido en el sitio, usando para esto diferentes fuentes de información.
4. Ampliar la caracterización del sitio Surtubal de Turrubares (Costa Rica) el cual se separó en la evaluación molecular, para detectar posibles diferencias de la población de este sitio con respecto a las demás.
5. Incluir en un nuevo estudio molecular, genotipos de otras procedencias fuera del área centroamericana, así como reforzar los materiales de esta área, para determinar con mayor precisión la posible existencia de grupos genéticos del Atlántico y Pacífico y del Norte y Sur del continente americano.

7. BIBLIOGRAFIA

- ANDERSEN, W. R.; FAIRBANKS, D. J. 1990. Molecular Markers: Important Tools for Plant Genetic Resource Characterization. *Diversity*, 6 (3- 4): 51-53.
- AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.; MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.; SORRELLS, M. 1996. Genetic Diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. *Crop Science* 36:735-742.
- BADILLA, B.; MIRANDA, T.; MORA, G.; VARGAS, K. 1998. Actividad gastrointestinal del extracto acuoso bruto de *Quassia amara* (Simarubaceae). *Rev. Biol. Trop.*, 46(2): 203-210.
- BROWN, A. H. D. 1978. Isozymes, plant population genetic structure and genetic conservation. *Theor. Appl. Genet.* 52:145-157.
- BROWN, N. R. 1995. The autoecology and agroforestry potential of the bitterwood tree *Quassia amara* L. ex. Blom (Simaroubaceae). Thesis Ph. D. Cornell University. 250 p.
- CACERES, A.; MEJIA, T; OCAMPO, R.A.; VILLALOBOS, R. 1959. *Quassia amara* L. ex Blom (Simaroubaceae). *In: Potencial de Quassia amara* como insecticida natural. Editor: Rafael A. Ocampo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Proyecto Olafo. Turrialba, Costa Rica. pp. 156-178.
- CAETANO-ANOLLES, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *In: PCR Methods and Applications*, (cold spring Harbor Lab.) Press ISSN: 85-94.
- CATIE- Proyecto de Conservación para el desarrollo sostenible en América Central (Olafo). 1997. Distribución natural de *Quassia amara* en Costa Rica. Guía Agropecuaria de Costa Rica. Año 13 (27): 8-12.
- CHICAIZA, O. 1991. Uso de marcadores moleculares (RFLPs) en caracterización de germoplasma. *In Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales*. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. Pp. 167-173.

- COCHRAN, W. 1954. Some methods for strengthening the common X^2 tests. *Biometrics* 10:417-451.
- CORNIDE, 1998. Procesamiento e interpretación de la variabilidad genética. P. 26-33.
- COX, T. S.; KIANG, Y. T.; GORMAN, M. B.; RODGERS, D. M. 1985. Relationship Between Coefficient of Parentage and Genetic Similarity Indices in the Soybean. *Crop Science* 25:529-532.
- CROAT, T. 1978. Flora of Barro Colorado Island. Stanford University Press.
- CRONQUIST, A. 1994. Estudios in the Simaroubaceae - IV resume of the American genera. *Britonia* 5:128-147.
- CUBILLO, D.; SANABRIA, G.; HILJE, L. 1997. Mortalidad de adultos de *Bemisia tabaci* con extractos de hombre grande (*Quassia amara*). *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* 45: 25-29.
- DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small amounts of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- EDWARDS, A.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* 19:1349.
- EFRON, B.; TIBSHIRANI, R. 1993. An introduction to the bootstrap. Chapman and Hall, New York. S.p.
- ENGELS, J. M.M. 1983 a. A systematic description of cacao clones. 1. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* 32: 377-385.
- 1983 b. A systematic description of cacao clones. II. The discriminative value of qualitative characteristics and the practical compatibility of the discriminative value of quantitative and qualitative descriptors. *Euphytica* 32: 387-396.
- ENRÍQUEZ, G. 1966. Selección y estudio de caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis Mag. Sc. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la OEA, Centro de Enseñanza e Investigación. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 97 p.

- . 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *In* Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. Pp. 116-160.
- FALCONER, D. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman, New York. 340 p.
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39 (4): 783-791.
- FIENBERG, S. 1977. The analysis of cross-classified data. Cambridge, MA: MIT Press.
- GARCIA, H. 1992. Flora Medicinal de Colombia. (Botánica Médica II) 2ª. Ed. Bogotá. Colombia, Tercer Mundo. P. 44-47.
- GARCIA, M.; GONZALEZ, S. M.; PAZOS, L. 1997. Actividad farmacológica del extracto acuoso de la madera de *Quassia amara* (Simarubaceae) en ratas y ratones albinos. *Rev. Biol. Trop.* 44(3)/45(1):47-50.
- GILLIES, A. C. M.; CORNELIUS, J. P.; NEWTON, A. C.; NAVARRO, C.; HERNÁNDEZ, M. WILSON, J. 1997. Genetic variation in Costa Rican populations of the tropical timber species *Cedrela odorata* L. Assessed using RAPDs *Molecular Ecology*.
- GONZÁLEZ, J. C.; TRABANINO, E. 1994. Diagnóstico de El Salvador. *In*: Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. Actas de la reunión técnica centroamericana (Turrialba). Ocampo, R. A. Ed. Turrialba, CATIE-OPS/OMS-OEA p. 28-39.
- GOODMAN, M. M.; PATERNIANI, E. 1969. The Races of Maize: III. Choices of Appropriate Characters for Racial Classification. *Economic Botany*. 265-273.
- GOWER, J. 1967. A Comparison of some methods of cluster analysis. *Biometrics* 23:623-637.
- GRAINGE, M.; AHMED, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. John Wiley & Sons, New York. 470 p.
- GRANDOLINI, G.; CASINOVI, C. G.; BARBETTI, P.; FARDELLA, G. 1987. A new neocoumarin derivative from *Quassia amara*. *Phytochemistry*, 26 (11): 3085-3087.
- HARRIS, S.A. 1996. Molecular analysis of forest tree biodiversity-A selection of practical protocols. Department of Plant Sciences. University of Oxford. 47 p.

- HERNÁNDEZ, O. 1998. Temas de análisis estadístico multivariado. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, C. R. 169 p.
- HILLIS, D. M. 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. *An. Rev. Ecol. Syst.* 18:23-42.
- HAINES, R. J.; MARTIN, B. E. 1995. Biotechnology and sustainable production of tropical timber. International tropical timber organization. Australia 168 p.
- HOLDRIDGE, L. 1967. Life Zone Ecology. Tropical Science Center. San José, Costa Rica. IICA. 216 P.
- HOLDRIDGE, L.; POVEDA, L. J. 1975. Árboles de Costa Rica. Centro Científico Tropical, San José, Costa Rica. 1: 438 p.
- IBPGRI, 1995. Introduction to collecting -2- Unit 8.1.1. Version 1.3. p. 2-25
- JUDEZ, L. 1989. Técnicas de análisis de datos multidimensionales. Bases teóricas y aplicaciones en agricultura. Ministerio de Agricultura pesca y alimentación. Secretaría General Técnica. Paseo Infanta Isabel. Madrid. 300 p.
- KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K. V.; AYAD, W. G.; HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy.
- KENT, J.; AMMOUR, T. 1995. Análisis financiero y económico de *Quassia amara* como insecticida natural. *In* Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. CATIE, Turrialba, CR. Serie Técnica, Informe Técnico. No. 267. Pp 120-127.
- LEIGUE, L. S. 1997. Elementos ecológicos para la silvicultura de *Quassia amara* en Talamanca, Costa Rica. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 92 p.
- LYCH M.; MILLIGAN B. G. 1994. Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3:91-99.
- LING, F. 1995. Estudio ecológico de *Quassia amara* en la Reserva Indígena de Kéköldi, Costa Rica. *In*: Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Editor: R. A. Ocampo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Proyecto Olafo. Turrialba, Costa Rica. Pg.56-67.
- LOAIZA, J.; BARRIOS, M.; VILLEGAS, J.; ESQUIVEL, G.; MENESES, D.; XATRUCH, C. 1996. Elaboración y utilización de extractos de plantas con acción biocida en

- frijol y tomate. *In*: X Congreso Nacional Agronómico/III Congreso de Fitopatología. Memoria Fitopatología. Editores: Floria Berths
- LOVELESS, M. D. 1992. Isozyme variation in tropical trees: pattern of genetic organization. *New Forest*. 6: 67-94.
- LOWE, A.; HANOTTE, O.; GUARINO, L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter* 107:50-54.
- MAG (Ministerio de Agricultura y Ganadería) 1978. Mapa Ecológico de El Salvador. Febrero.
- MANCIBO, F. 1998. Efecto de extractos vegetales sobre la alimentación y el desarrollo de larvas de *Hypsipyla grandella* (Zeller). Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 83 p.
- MARMILLOD, D.; CHANG, Y.; BEDOYA, R. 1995. Plan de aprovechamiento sostenible de *Quassia amara* en la Reserva Indígena de Kéköldi. *In*: Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Editor: Rafael A. Ocampo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Proyecto Olafo. Turrialba, Costa Rica. Pg. 68 – 90.
- MARTÍNEZ, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en la investigación agrícola. *Agronomía colombiana* Vol. XII (1) 66-71 p.
- MATEUCCI, S. y COLMA, A. 1982. Metodología para el estudio de la vegetación. Ed. Eva V. Chesneau. EE. UU. OEA, 168 p.
- MUNSELL color Charts for plant tissues. 1963. Munsell Color Compny, Inc. Maryland, USA. 17 p.
- MULLIS, K.B.; FALOONA, F. A. 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335.
- MUNTHALI, M.; FORD-LLOYD, B.; NEWBURY, H. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR. Methods Appl.* 1:274-276.

- NIENHUIS, J.; TIVANG, J. y SKROCH, P. 1995. Genetic Relationships among Cultivars and Landraces of Lima Bean (*Phaseolus lunatus* L.) as Measured by RAPD Markers. J. Amer. Soc. Hort Sci. 120(2):300-306.
- NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 70: 3321-3323.
- NEI, M.; LI, W. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76:5269-5273.
- N'GORAN, J.A.; LAURENT, V.; RISTERUCCI, A. M.; LANAUD, C. 1994. Comparative genetic diversity studies of *Theobroma cacao* L. using RFLP and RAPD markers. Heredity 73 : 589-597.
- NOOTEBOOM, H. P. 1962. Generic delimitation in Simaroubaceae Tribus Simaroubaceae and a conspectus of the genus *Quassia*. Blumea 14:309-315.
- 1972. Simaroubaceae. Flora Malesiana Series 1: Spermatophyta. Vol. 6:193-203.
- OCAMPO, R.A. 1995. Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Serie Técnica. Informe Técnico No. 267. 177 p.
- OCAMPO, R.; VILLALOBOS R.; CIFUENTES M. 1997. Productos no maderables del bosque en Baja Talamanca, Costa Rica. Turrialba, C. R. CATIE. Proyecto Conservación para el Desarrollo Sostenible en América Central. 118 p.
- OKADA, K. 1991. Principios sobre exploración y recolección de recursos fitogenéticos. In Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. P.41-51
- OTERO, A. DE LA CRUZ, M. OYANA, K. 1997. El uso de los RAPDs como marcadores moleculares en plantas. Bol. Soc. Bot. México. 60:85-117.
- PÉREZ, E. 1990. Plantas útiles de Colombia. 14 ed. Víctor Hugo Medellín. 695-697.
- PHILLIPS-MORA, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. J. 1995. Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de Trabajo. Unidad de Biotecnología. Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica. 183 pp.
- PORTER, D.M. 1972. Simaroubaceae. In Flora de Panamá. Woodson, R. ed. Missouri Botanical Garden 60:23-39.

- _____. 1998. Marcadores moleculares en plantas. Curso de Biología Molecular. Laboratorio de Biología Molecular, CATIE. 29 p.
- POVEDA, L. J. 1995. Taxonomía de *Quassia amara* y su distribución en el Neotrópico. *In: Potencial de Quassia amara* como insecticida natural. Editor: Rafael A. Ocampo. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Proyecto Olafo. Turrialba, Costa Rica. Pg. 11-13.
- POWELL, W. 1992. Plant, genomes, gene marker and linkage maps. *In* Moss, J. P. ed. Biotechnology and crop improvement in Asia. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. 297-322.
- QUEROL, D. 1992. Recursos Genéticos, nuestro tesoro olvidado. Lima, Perú, 252 p.
- RAO, R.; RILEY, K. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter* 97: 3-19.
- RINCÓN, F. 1991. Documentación y la utilización de los recursos fitogenéticos: el papel del IBPGR. *In: Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales*. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. 174 - 181.
- RUANO, G.; BRASH, D.E.; KIDD, K.K. 1991. PCR: the first few cycles. *Perkin Elmer Cetus. Amplifications* 7.
- SAIKI, R.K.; GELFAND, D.H.; STOFFEL, S.; SCHARF, S.J.; HIGUCHI, R. HORN, G.T.; MULLIS, K.B.; ERLICH, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. 2ª. Edición. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. Sobral . B.W. S. and Honeycutt. R. 1993. High output genetic mapping of poliploids using PCR generated markers. *Theor. Appl. Genet.* 86: 105-112.
- SCHEAFFER, R. L.; MENDENHALL, W. y OTT, L. 1987. Elementos de muestreo. 3ª Ed. Grupo Editorial Iberoamérica, S. A. de C. V. Mexico, D. F. 321 pp.
- SCHEEPERS, D., M-C ELOY; BRIQUET, M. 1997. Use of RAPD patterns for clone verification and in stuying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor Appl Genet* 94: 480-485.



- SCHUT, J.; QI, X.; STAM, P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor Appl. Genet* 95:1161-1168.
- SEVILLA, R.; HOLLE, M. 1995. Recursos genéticos vegetales. Lima, Perú. 320 p.
- SOUZA, E.; SORRELLS, M. E. 1991a. Relationships among 70 North American Oat Germplasms: I. Cluster Analysis Using Quantitative Characters. *Crop Sci.* 31:599-605.
- _____ 1991b. Relationships among 70 North American Oat Germplasms: II. Cluster Analysis Using Qualitative Characters. *Crop Sci.* 31:605-612.
- STANDLEY, P. C. 1937. Flora of Costa Rica. Part II. Publication 392. Field Museum Press. 780 p.
- _____ y STEYERMARK, J. 1946. Flora of Guatemala. *Fieldiana: Botany* 24 (5): 431 - 432.
- STEEL, G.; TORRIE, J. 1980. Principles and procedures of statistics: A biometric approach. McGraw -Hill, New York.
- TABA, S. 1991. Caracterización y evaluación de germoplasma de maíz. *In* Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. Pp. 161-173.
- TAPIA, C. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (Lam) Spreng. del CATIE. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 157 p.
- TIVANG, J.; NIENHUIS, J.; SMITH, O.S. 1994. Sampling variances of molecular marker data sets using the bootstrap. *Theoretical Applied Genet.* 67:25-33.
- THOMAS, W. W. 1990. The american genera of Simaroubaceae and their distribution. *Acta Botánica Brasilica* 4 (1):11-18.
- TORRES, C. 1994. Diagnóstico de Honduras. *In*: Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. Actas de la reunión técnica centroamericana (1994 Turrialba). Ocampo, R. A. Ed. Turrialba, CATIE- OPS/OMS-OEA. p. 40-45

- UPEGUI, C. 1998. Caracterización morfológica de *Quassia amara* en poblaciones silvestres de Centroamérica para determinar su variabilidad. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 115 p.
- VAN DE VEN, W.; McNICOL, R. 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity* 75: 126-132.
- VASQUEZ, S. A. 1998. Estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de caoba (*Swietenia macrophylla* King.) del área de Centroamérica y México. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 93 p.
- VILLALOBOS, R.; OCAMPO, R. 1997. Productos no maderables del bosque en Centroamérica y el Caribe: Actas. CATIE, OLAFO, CCAB-AP. Turrialba, Costa Rica: CATIE. 112 p.
- VILLALOBOS, R. 1995. Distribución de *Quassia amara* L. Ex Blom en Costa Rica, y su relación con los contenidos de cuasina y neocuasina (insecticidas naturales) en sus tejidos. Tesis M. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 174 p.
- WALTON, M. 1993. Molecular Markers: which ones to use. *Seed World*. 22-29.
- WAUGH, R.; POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 10: 186-192.
- WARD, Jr. J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* 58:236-244.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*. 18 (24): 7213-7218.
- WEISING, K.; NYBOM H.; WOLFF K.; MEYER, W. 1995. DNA fingerprinting in Plants and Fungi. CRC Press, Inc. London.
- WILLIAMS, J; KUBELIK, A.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J.; TINGEY S. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*. 18 (22) 6531-6535.
- WILLIAMS, J.; HANAFEY, M.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic markers. *Methods Enzymol*. 218: 704-740.
- WOLFE, A.D.; LISTON, A. 1997. Contributions of PCR based Methods to Plant Systematics and Evolutionary Biology. documento de internet (por Aaron Rodriguez: aaronrodriguez@hotmail.com)

- YAP, I.V. y NELSON, R.J. 1996. WinBoot: A program for performing bootstrap analysis of binary data to determine the confidence limits of UPGMA-based dendograms. IRRI. Philippines. 22 p.
- YEH, F. C.; YANG, R.; BOYLE, T. 1997. Popgene version 1,21. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. A joint proyect development by Francis C, Yeh ando Rong Cai Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry research.

APENDICES

APÉNDICE 1**MÉTODO CTAB-MINIPREPARACIONES PARA EXTRAER ADN DE LAS MUESTRAS DE *Quassia amara*. (Doyle y Doyle, 1987, Modificado por Harris, 1996)**

1. Macerar muy bien 0,2 g de hojas en un mortero con Nitrógeno líquido. Colocar el polvo en un ependorf de 1,5 ml y agregar 100 µl de buffer 2XCTAB. Macerar fuertemente con un pistilo.
2. Adicionar 900 µl de buffer y luego 2 µl de mercaptoetanol (en cámara de gases). Cerrar la tapa, agitar con el vortex hasta uniformizar.
3. Incubar en baño María a 65°C por 30 minutos. Dejar enfriar 4 minutos.
4. Adicionar 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol a T° ambiente (cámara de gases) y mezclar fuertemente con el vortex. Microcentrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos.
5. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repita el paso anterior.
6. Transferir el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una micropipeta del 1 ml. Llenar el tubo con isopropanol (-20°C) y mezclar ligeramente para precipitar el ADN. Dejar reposar 60 minutos en el congelador.
7. Centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos. Eliminar el alcohol.
8. Adicionar 1 000 µl de buffer de lavado (76% etanol y 10 mM de acetato de amonio) y dejar reposar por 20 minutos a T° ambiente.
9. Eliminar el buffer de lavado invirtiendo el tubo y dejar secar al aire.
10. Agregar 100 µl de TE (0.5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspender agitando levemente.
11. La muestras se precipitan en etanol absoluto (1 ml) y se dejan a -20°C toda la noche.
12. Centrifugar a 10 000 rpm, 3 minutos, dejar secar a temperatura ambiente.
13. Preparar una solución de RNAsa a 10µg/µl y agregar 300 µl por tubo, se inocula a temperatura ambiente por 30 minutos.
14. Precipitar nuevamente con etanol (1 ml), mantener a -20°C toda la noche.
Centrifugar y secar todas las muestras, paso No. 12 al secarse agregar 100 µl de TE.

APENDICE 2**METODOLOGÍA PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ADN CON ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA.**

1. Preparar suficiente "buffer" TBE 0,5X para la cámara de electroforesis y para el gel.
2. Preparar 100 - 200 ml de una solución de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X. Calentar hasta que la agarosa se disuelva.
3. Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente como para ser sostenida en la mano, vaciarla en la cubeta de electroforesis.
4. Por cada muestra colocar en sendos tubos Eppendorf los siguientes ingredientes:
1 μ l ADN + 17 μ l TE + 2 μ l "loading buffer" Bpb = 20 μ l.
5. Preparar el marcador de pesos moleculares (Fago Lambda/Hind) adicionando en un Eppendorf:
1 μ l Fago Lambda/Hind III (50 μ g/ μ l) + 17 μ l TE + 2 μ l "buffer" Bpb.
6. Agitar cada muestra con un vortex y colocarlas en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Ubicar estratégicamente el marcador de pesos moleculares.
7. Llenar la cámara de electroforesis con aproximadamente 1,5 L de "buffer " TBE 0,5X hasta 0,3 cm por encima del gel.
8. Cerrar la cámara de electroforesis, colocar adecuadamente los cables y poner a funcionar hasta que las bandas muestren un adecuado nivel de avance (aproximadamente 1 hora).
9. Al finalizar la electroforesis colocar el gel en una solución de bromuro de etidio durante 30 - 60 minutos.
10. Lavar el exceso de solución transfiriendo el gel a una bandeja con agua destilada en donde permanece 15 minutos.
11. Con una lámpara ultravioleta observar el resultado de electroforesis y obtener la fotografía del gel.
12. Determinar la concentración de ADN comparando la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular con las bandas obtenidas por las muestras.

APENDICE 3

SOLUCION TAMPON TE. (Sambrook, *et al.* 1989).

REACTIVO	CONCENTRACION
EDTA 0,5 M	1 mM
TRIS-HCl 1 M	10 mM
AGUA DESTILADA	

APÉNDICE 4.

PREPARACION DE SOLUCION MAESTRA (MASTER MIX)

1. Descongelar, centrifugar y mezclar en un tubo Eppendorf los oligonucleótidos (10mM) en partes equitativas (320 μ l/nucleótido). Agitar suavemente.

2. En un tubo limpio y preferiblemente autoclavado adicionar los siguientes reactivos:

Oligonucleótidos (10mM)	180 μ l
MgCl ₂ (25mM)	210 μ l
Buffer de reacción Stoffel (10X)	180 μ l
Agua pH 8	30 μ l

Para cada reacción se utiliza:

	Concentración	Volumen
Oligonucleótidos :		3 μ l
dCTP	0,3 Mm	
dATP	0,3 mM	
dTTP	0,3 mM	
dGTP	0,3 mM	
MgCl ₂	3,5 mM	3,5 μ l
Buffer reacción Stoffel:		3 μ l
Tris (100mM)	12 mM	
KCl (100 mM)	12 mM	
Agua pH8		0,5 μ l

APENDICE 5
FORMULARIO PARA LA TOMA DE DATOS PARA LA CARACTERIZACION
MORFOLOGICA DE *QUASSIA AMARA* L. ex. BLOM.

inscripción																
FLOR	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Largo del pedicelo (mm)																
Ancho base corola (mm)																
Largo pétalo (mm)																
Ancho del pétalo (mm)																
Color distal pétalo																
Color proximal pétalo																
Número de estambres																
Largo estambres (mm)																
Largo del gineceo (mm)																
FRUTO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Largo del eje central (mm)																
Largo pedúnculo (mm)																
Forma base receptáculo																
Forma imbricación drupa																
Color del receptáculo																
Largo drupa madura (mm)																
Ancho drupa madura (mm)																
Forma drupa madura																
Color drupa madura																
Color drupa inmadura																
SEMILLA	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
Largo semilla (mm)																
Ancho semilla (mm)																
Forma de la semilla																
Color de la semilla																

OBSERVACIONES

APÉNDICE 6**DESCRIPCIÓN DE LOS CARACTERES MORFOLÓGICOS SELECCIONADOS
PARA LA CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE POBLACIONES
SILVESTRES DE *QUASSIA AMARA*.**

A. HOJA: en todos los casos se utilizaron diez hojas adultas, con cinco folíolos cada una.

1. **Longitud de la hoja:** medida en mm. Desde la base del peciolo al ápice del folíolo terminal.
2. **Ancho de la hoja:** medida en mm. Desde el ápice del folíolo izquierdo "1" (superior, visto en el haz) al ápice del folíolo derecho "1" de la hoja.
3. **Longitud del peciolo:** medido en mm. Desde el punto de inserción de la hoja en el tallo al punto de inserción del primer par de folíolos (inferiores).
4. **Ancho en la mitad del peciolo:** en mm. Medido en la mitad del peciolo.
5. **Ancho en la cuarta parte del peciolo:** en mm. En la cuarta parte superior del peciolo.
6. **Longitud del raquis:** en mm. Desde el punto de inserción del primer par de folíolos (inferiores) al punto de inserción del folíolo terminal.
7. **Ancho en la mitad del raquis:** en mm. Medida transversal a la mitad del raquis.
8. **Ancho en la cuarta parte del raquis:** en mm. Medida transversal en la cuarta parte superior del raquis.
9. **Longitud del folíolo terminal:** en mm. Desde el punto de inserción en el raquis al ápice.
10. **Ancho del folíolo terminal:** en su ancho máximo (mm).
11. **Longitud del ápice del folíolo terminal:** en mm, desde la base del ápice hasta su parte terminal.
12. **Ancho de la base del ápice del folíolo terminal:** en mm. Medido en línea transversal a partir del inicio de la curvatura de la lámina foliar del folíolo terminal.
13. **Longitud del folíolo izquierdo 1:** en mm. Desde el punto de inserción en el raquis al ápice; al lado izquierdo de la hoja vista en el haz.
14. **Ancho del folíolo izquierdo 1:** en mm. Medido en su ancho máximo.

15. **Angulo de inserción del foliolo izquierdo 1:** medido entre la vena principal del foliolo y el eje del raquis.
16. **Longitud del foliolo izquierdo 2:** en mm. En uno del primer par de foliolos (inferiores, vista la hoja en el haz), desde el punto de inserción en el raquis al ápice.
17. **Ancho del foliolo izquierdo 2:** en mm. En su ancho máximo.
18. **Angulo de inserción del foliolo izquierdo 2:** medido entre la vena principal del foliolo y la del peciolo.
19. **Color del punto de inserción del foliolo terminal en el raquis:** observado en el haz, utilizando la tabla de colores de Munsell.
20. **Color del haz del foliolo terminal:** en el centro de la lámina foliar, utilizando la tabla de colores de Munsell.
21. **Color del envés del foliolo terminal:** igual que en el anterior.

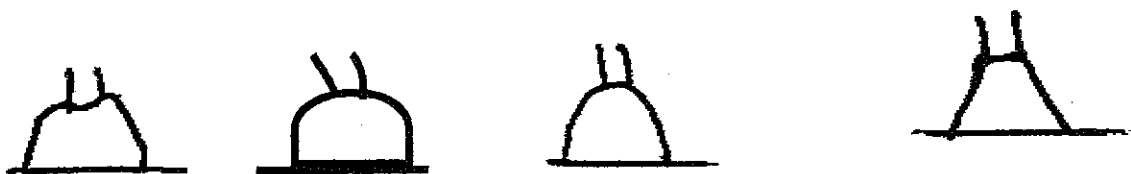
B. FLOR ADULTA: (tres flores de cada una de cinco inflorescencias, tomadas en la parte proximal de cada inflorescencia).

1. **Longitud del pedicelo:** en mm. Desde el punto de inserción en el eje floral a la base de la flor.
2. **Ancho de la base de la corola:** medición en mm del diámetro de la base.
3. **Longitud de los pétalos:** en mm, desde el punto de unión con el cáliz al extremo distal.
4. **Ancho de los pétalos:** en mm, en el punto medio de la longitud (se midió un pétalo de cada flor).
5. **Color del extremo proximal de los pétalos:** igual que en el anterior.
6. **Color del extremo distal de los pétalos:** se utilizó la tabla de colores de Munsell.
7. **Número de estambres:** se contó el número de estambres por flor.
8. **Longitud de los estambres:** en mm, desde el punto de inserción en la base de los pétalos a la antera, utilizando una regla.
9. **Longitud del gineceo:** en mm, desde la base del gineceo hasta el estigma, utilizando una regla.

Después de la evaluación preliminar para tamaño mínimo de muestra se decidió evaluar solamente el color en la parte media de los pétalos, por lo que se eliminó las características 5 y 6, se tomó como número 5: color medio del pétalo.

C. FRUTO MADURO: (Quince drupas)

1. **Longitud del eje central:** en mm, desde el punto de inserción en el tallo al extremo distal.
2. **Longitud del pedúnculo:** en mm, desde el punto de inserción en el eje central a la base del fruto.
3. **Forma de la base del receptáculo:** hundida (1), aplanada (2), inflada (3), puntiaguda (4)



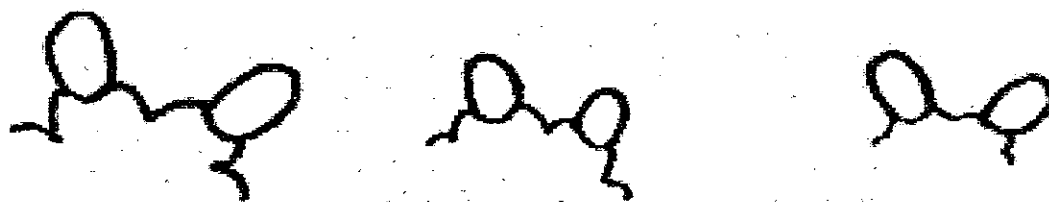
1: hundida

2: aplanada

3: inflada

4: puntiaguda

4. **Forma de imbricación de la drupa en el receptáculo:** muy protuberante (1), protuberante (2), poco protuberante (3). (ver anexo 2)



1: Muy protuberante

2: Protuberante

3: Poco protuberante

5. **Color del receptáculo:** utilizando la tabla de colores de Munsell.

6. **Longitud de la drupa:** en mm, desde el punto de inserción en el receptáculo hasta el extremo distal.
7. **Ancho de la drupa :** promedio de dos mediciones en perpendicular.
8. **Forma de la drupa:** esferoide (1), elipsoide (2), ovada (3).



1: esferoide



2: elipsoide



3: ovada

9. **Color de la drupa madura:** utilizando la tabla de colores de Munsell.
10. **Color de la drupa inmadura:** igual que el anterior.

Las mediciones se hicieron en drupas maduras, razón por la cual se eliminó la característica No. 10 (color de la drupa inmadura) en el análisis.

D. SEMILLA: (en quince semillas).

1. **Longitud:** en mm, desde el punto de inserción en el receptáculo al extremo distal, se utilizó un vernier
2. **Ancho:** promedio de dos mediciones, se utilizó un vernier.
3. **Forma:** igual que para drupa.

APENDICE 7.

Cuadro de diversidad genética de las poblaciones de *Quassia amara*. Popgene (1997).

Locus	Sample Size	Ht	Hs	Gst	Nm*
B1	19	0.4583	0.1220	0.7338	0.1814
B2	19	0.2010	0.1750	0.1294	3.3650
B3	19	0.3217	0.1925	0.4016	0.7449
B4	19	0.3805	0.3044	0.1999	2.0018
B5	19	0.4305	0.3223	0.2512	1.4908
B6	19	0.4219	0.0828	0.8038	0.1221
B7	19	0.2765	0.2460	0.1104	4.0288
B8	19	0.1840	0.1432	0.2213	1.7593
B9	19	0.2527	0.2182	0.1367	3.1587
B10	19	0.4678	0.1974	0.5780	0.3650
B11	19	0.4732	0.1958	0.5862	0.3529
B12	19	0.4972	0.3243	0.3477	0.9378
B13	19	0.3583	0.0302	0.9157	0.0460
B14	19	0.4703	0.1522	0.6764	0.2393
B15	19	0.2063	0.1920	0.0691	6.7409
B16	19	0.2374	0.2128	0.1036	4.3272
B17	18	0.4017	0.3481	0.1335	3.2447
B18	18	0.4984	0.2464	0.5056	0.4889
B19	18	0.4371	0.2167	0.5043	0.4915
B20	19	0.2993	0.2317	0.2258	1.7139
B21	19	0.4981	0.2970	0.4036	0.7388
B22	19	0.3528	0.2211	0.3733	0.8393
B23	19	0.1750	0.1187	0.3219	1.0532
B24	19	0.4893	0.1036	0.7884	0.1342
B25	17	0.4729	0.1244	0.7369	0.1785
B26	17	0.2938	0.2256	0.2322	1.6535
B27	19	0.4379	0.3136	0.2839	1.2609
B28	19	0.4238	0.0956	0.7743	0.1457
B29	19	0.4539	0.1577	0.6526	0.2662
B30	19	0.3293	0.2003	0.3917	0.7766
B31	19	0.3532	0.3066	0.1319	3.2898
B32	19	0.4754	0.1800	0.6213	0.3047
B33	19	0.4219	0.0828	0.8038	0.1221
B34	19	0.4766	0.3582	0.2484	1.5130
B35	19	0.3840	0.3180	0.1718	2.4099
B36	19	0.3821	0.3130	0.1810	2.2628
B37	19	0.3169	0.2599	0.1799	2.2797
B38	19	0.4760	0.2252	0.5269	0.4489
B39	19	0.2527	0.2182	0.1367	3.1587
B40	19	0.4036	0.2426	0.3991	0.7528
B41	19	0.4998	0.3061	0.3876	0.7901
B42	19	0.2627	0.1176	0.5524	0.4051
B43	19	0.4652	0.1984	0.5736	0.3717
B44	19	0.1767	0.1673	0.0531	8.9083
B45	19	0.0987	0.0924	0.0640	7.3180
B46	18	0.4865	0.2594	0.4668	0.5711
B47	18	0.4771	0.3100	0.3503	0.9275
B48	18	0.4723	0.1880	0.6020	0.3306

B49	18	0.4702	0.1845	0.6076	0.3229
B50	18	0.4059	0.3387	0.1656	2.5197
B51	18	0.3455	0.2464	0.2867	1.2438
B52	18	0.4729	0.1244	0.7369	0.1785
B53	19	0.4988	0.2931	0.4125	0.7122
B54	19	0.3906	0.0302	0.9227	0.0419
B55	19	0.4902	0.2707	0.4478	0.6166
B56	19	0.4748	0.2128	0.5518	0.4062
B57	18	0.3468	0.2916	0.1593	2.6380
B58	19	0.4812	0.1187	0.7534	0.1637
B59	19	0.4640	0.1958	0.5780	0.3651
B60	19	0.4684	0.1563	0.6662	0.2506
B61	19	0.3333	0.0654	0.8037	0.1221
B62	19	0.4910	0.3600	0.2667	1.3745
B63	19	0.3528	0.2211	0.3733	0.8393
B64	19	0.4979	0.2910	0.4156	0.7032
B65	19	0.4812	0.1187	0.7534	0.1637
B66	19	0.3461	0.2065	0.4033	0.7397
B67	19	0.3821	0.3130	0.1810	2.2628
B68	19	0.3594	0.2505	0.3031	1.1496
B69	19	0.4981	0.2970	0.4036	0.7388
B70	19	0.4583	0.1220	0.7338	0.1814
B71	19	0.4640	0.1958	0.5780	0.3651
B72	19	0.4978	0.0580	0.8835	0.0660
B73	19	0.4516	0.1176	0.7397	0.1759
B74	19	0.2844	0.1478	0.4804	0.5408
B75	19	0.4305	0.3223	0.2512	1.4908
B76	19	0.4899	0.2256	0.5396	0.4267
B77	19	0.2057	0.1244	0.3951	0.7656
B78	19	0.4411	0.1478	0.6650	0.2519
B79	19	0.1750	0.1187	0.3219	1.0532
B80	19	0.2953	0.2707	0.0834	5.4955
B81	19	0.4831	0.2048	0.5761	0.3680
B82	19	0.4807	0.1577	0.6719	0.2441
B83	19	0.4893	0.1036	0.7884	0.1342
B84	19	0.4993	0.2470	0.5052	0.4896
B85	19	0.4993	0.2470	0.5052	0.4896
B86	19	0.2593	0.1187	0.5423	0.4220
B87	19	0.3835	0.2494	0.3496	0.9301
B88	19	0.5000	0.0000	1.0000	0.0000
B89	19	0.4999	0.2494	0.5010	0.4979
B90	19	0.4902	0.2707	0.4478	0.6166
B91	19	0.0992	0.0828	0.1658	2.5166
B92	19	0.4478	0.1143	0.7448	0.1713
B93	19	0.4970	0.2380	0.5211	0.4596
B94	19	0.4305	0.3223	0.2512	1.4908
B95	19	0.3821	0.3130	0.1810	2.2628
B96	19	0.4995	0.0302	0.9395	0.0322
B97	19	0.3066	0.1756	0.4273	0.6701
B98	19	0.4729	0.1244	0.7369	0.1785
B99	14	0.4964	0.1892	0.6189	0.3079
B100	19	0.4835	0.2499	0.4831	0.5350
B101	19	0.4167	0.0749	0.8202	0.1096
B102	19	0.4993	0.2922	0.4149	0.7051

B103	19	0.4657	0.1785	0.6168	0.3106
B104	19	0.4893	0.1036	0.7884	0.1342
B105	19	0.3393	0.0580	0.8290	0.1031
B106	18	0.4107	0.0654	0.8407	0.0948
B107	18	0.4675	0.3640	0.2214	1.7583
B108	18	0.4926	0.0923	0.8127	0.1152
B109	17	0.2938	0.2256	0.2322	1.6535
B110	19	0.4875	0.1999	0.5899	0.3476
B111	19	0.3982	0.3292	0.1733	2.3854
B112	19	0.4073	0.0645	0.8415	0.0942
B113	19	0.4062	0.0580	0.8572	0.0833
B114	19	0.2627	0.1176	0.5524	0.4051
B115	19	0.4945	0.0828	0.8326	0.1005
B116	19	0.2188	0.1250	0.4286	0.6667
B117	19	0.4219	0.0828	0.8038	0.1221
B118	19	0.3726	0.2362	0.3659	0.8664
B119	19	0.4902	0.1486	0.6969	0.2175
B120	19	0.4703	0.1522	0.6764	0.2393
B121	19	0.3289	0.1892	0.4247	0.6772
B122	19	0.3583	0.0302	0.9157	0.0460
B123	19	0.4411	0.1478	0.6650	0.2519
B124	19	0.3071	0.2343	0.2372	1.6083
B125	19	0.3444	0.2750	0.2015	1.9812
B126	19	0.0318	0.0302	0.0492	9.6555
B127	19	0.4638	0.1530	0.6701	0.2462
B128	19	0.3493	0.2931	0.1610	2.6060
B129	19	0.4062	0.0580	0.8572	0.0833
Mean	19	0.3982	0.1918	0.5183	0.4647
St. Dev		0.0106	0.0079		

* Nm = estimado del flujo de genes de Gst o Gcs. Ejemplo: $Nm = 0.5(1 - Gst)/Gst$;

Ver McDermott and McDonald, Ann. Rev. Phytopathol. 31:353-373 (1993).

El número de loci polimórficos es: 129

El porcentaje de loci polimórficos es: 100.00