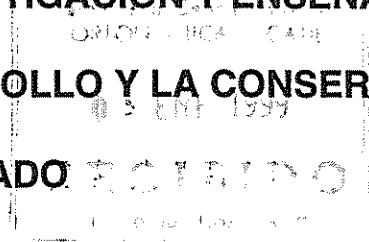


CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSTGRADO



CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE *Quassia amara* EN POBLACIONES SILVESTRES DE CENTROAMERICA PARA DETERMINAR SU VARIABILIDAD

POR

CLAUDIA BEATRIZ UPEGUI VALENCIA



Turrialba, Costa Rica
1998

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA

03 ENE 1998

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA
PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION
ESCUELA DE POSTGRADO

CARACTERIZACION MORFOLOGICA DE *Quassia amara* EN POBLACIONES SILVESTRES DE CENTROAMERICA PARA DETERMINAR SU VARIABILIDAD

Tesis sometida a consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar al grado de :

Magister Scientiae

por

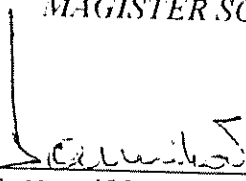
CLAUDIA BEATRIZ UPEGUI VALENCIA

Turrialba, Costa Rica
1998

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Daniel Marmillod
Profesor Consejero



Nelly Vásquez
Miembro Comité Asesor




Gabriel Robles
Miembro Comité Asesor



Wilbert Phillips
Miembro Comité Asesor



Gilberto Páez
Director y Decano de la Escuela de Postgrado



Claudia Beatriz Upegui Valencia
Candidato

DEDICATORIA

A Fernando de quien la muerte lo arrancó de mi, dejándome tantos recuerdos inolvidables, y quien con su ejemplo a través de el tiempo y la distancia me ha inspirado a seguir adelante.

A mi madre por su dedicación y su gran entrega de amor, sacrificio, y ayuda de siempre.

A mis bellas hermanas Diana y Lina mis grandes compañeras de vida, gracias por su apoyo y su profundo sentimiento hacia mi.

A mi bella sobrina Alejandra quien a pesar de su corta edad ha sido inspiración para esta tía que tanto la ama, a mis tías, todas tan lindas, mis tios, primas y primos.

A mis amigos y amigas del CATIE bien llamados brujos y brujas, de quienes guardare mis mejores recuerdos de amistad y solidaridad, especialmente a mi hermana Lily, a Carmen, a Martola mi Nica preferida a Sandra Andraka la española mas especial que vosotros habeis conocido, a Tangaxuhan por su ayuda y lección en mi vida, un compañero a toda madre!, a Alejo López Musalem, y a su bella amistad. A los hijos, esposas y esposos de mis compañeros.

A Glenn Galloway, por su estudio y dedicación, su amistad, por su vida, por no hacer mucho esfuerzo para convencerme de pensar que es un hombre maravilloso, por compartir lindos momentos conmigo y por su amor a mi vida.

A todos los Colombianos que compartimos un mismo sentimiento y que queremos luchar por nuestro país, aunque tengamos tantas fuerzas en contra, mis mejores deseos.

AGRADECIMIENTOS

A Nelly Vásquez por ayudarme en mi formación académica y personal, por ser una amiga para quienes hemos tenido el gusto de trabajar a su lado.

A Gabriel Robles por su entrega al trabajo y por no tener un reloj que parara cuando mas lo necesitaba.

A Wilberth Phillips por su apoyo a este trabajo y su preocupación por hacer mejor las cosas.

A Daniel Marmillod el que me lanzó al bosque por primera vez en mi vida.

A mis amigos de Postgrado, Jannette, Lucy Agüero, Rosmery, Martica, Emilio, Alfonso, Eduardo (Moli), Thomas, y Arturo Vargas, mil y mil gracias y miles amores.

A mis amigos de la Biblioteca Orton, y muy especialmente a Ady, Lizzette, Rigo, Catia, Javier, Gilberto, con mucho amor los recordaré siempre.

A los Olafo por su dedicación Maritza, Jose, Lorena, Tania Amour, Sandra etc.

Al combo de mis amigos que no eran estudiantes, pero de quienes he recibido mas que mi formación académica: Paulita, Doña Edith, a Elkin Bustamante por ser un hombre lleno de sabiduria, y por sus consejos gracias, a Miguel Caballero y doña Julieta, a la doctora Petra, Meivis, Laura, nunca los olvidaré!!

A Roci del gimnasio y a los chicos del club.

A Kloeber , por su ejemplo, a su esposa Rocio también por su ejemplo.

A Dios por su ayuda en mi profundo pensamiento.

TABLA DE CONTENIDO

RESUMEN	VII
SUMMARY	VIII
LISTA DE CUADROS.....	IX
LISTA DE FIGURAS.....	X
LISTA DE ANEXOS	XI
1. INTRODUCCION.....	1
2. OBJETIVO GENERAL	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	3
3. HIPOTESIS.....	4
4. PARTE I: CARACTERIZACION MORFOLOGICA E HISTOLOGICA.....	5
4.1. REVISIÓN DE LITERATURA.....	5
4.1.1. <i>Quassia amara</i>	5
4.1.1.1. Descripción botánica.....	5
4.1.1.2. Distribución natural.....	7
4.1.1.3. Fenología.....	9
4.1.1.4. Composición química del tallo.....	9
4.1.1.5. Utilidad para el hombre.....	10
4.1.2. <i>Caracterización</i>	11
4.1.3. <i>Colección de germoplasma</i>	15
4.1.4. <i>Histología</i>	17
4.1.4.1. Albura y duramen.....	19
4.1.4.2. Vasos.....	19
4.1.4.3. Distribución del parénquima xilemático.....	20
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	20
4.2.1. <i>Localización</i>	20
4.2.2. <i>Muestreo</i>	21
4.2.3. <i>Caracterización fenotípica de campo</i>	21
4.2.3.1. Descriptores de sitio.....	24
4.2.3.2. Descriptores del arbusto.....	25
4.2.3.3. Descriptores de hojas.....	27
4.2.3.4. Descriptores de la flor.....	29
4.2.3.5. Descriptores del fruto.....	30
4.2.3.6. Formulario de campo.....	32
4.2.4. <i>Caracterización histológica</i>	32

4.2.5. <i>Análisis estadístico de los resultados</i>	34
4.2.5.1. <i>Análisis univariado</i>	34
4.2.5.2. <i>Procedimiento w de Tukey</i>	34
4.2.5.3. <i>Prueba Chi-cuadrado</i>	34
4.2.5.4. <i>Prueba F</i>	34
4.2.5.5. <i>Análisis multivariado con discriminante canónico</i>	35
4.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.3.1. <i>Comportamiento de las variables</i>	36
4.3.1.1. <i>Variables morfológicas</i>	36
4.3.1.2. <i>Variables histológicas</i>	46
4.3.2. <i>Diferenciación de las poblaciones</i>	47
4.3.2.1. <i>Variables morfológicas</i>	47
4.3.2.2. <i>Variables histológicas</i>	51
4.4. CONCLUSIONES	54
4.4.1. <i>Comportamiento de las variables</i>	54
4.4.2. <i>Diferenciación de las poblaciones</i>	55
4.4.3. <i>Características cuantitativas y cualitativas</i>	55
4.4.3.1. <i>Características cuantitativas</i>	55
4.4.3.2. <i>Características cualitativas</i>	56
4.4.4. <i>Toma de datos</i>	56
5. PARTE II: METODOLOGIA DE EXTRACCION DE ADN	58
5.1. RESEÑA BIBLIOGRAFICA	58
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS	59
5.2.1. <i>Localización</i>	59
5.2.2. <i>Método de extracción</i>	59
5.2.3. <i>Material evaluado</i>	59
5.2.4. <i>Experimentos realizados</i>	61
5.2.5. <i>Metodología de análisis de los experimentos</i>	61
5.2.5.1. <i>Factorial</i>	61
5.2.5.2. <i>Procedimiento w de Tukey</i>	61
5.3. RESULTADOS Y DISCUSION	62
5.4. CONCLUSIONES	66
6. RECOMENDACIONES	68
7. LITERATURA CITADA	70
ANEXOS	75

UPEGUI, C. 1998. Caracterización morfológica de *Quassia amara* en poblaciones silvestres de Centro América para determinar su variabilidad. Tesis M.Sc., Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Palabras claves: *Quassia amara*, descriptores, caracterización, estudios histológicos, análisis univariado, análisis discriminante canónico, metodología de extracción de ADN.

RESUMEN

La región de Centro América y el El Caribe cuentan con bosques naturales que poseen una importante riqueza de productos no maderables, que ofrecen oportunidades de explotación, para aportar al desarrollo social y económico en las áreas rurales. *Quassia amara* es un arbusto utilizado como materia prima en la elaboración de insecticidas y medicinas naturales.

Debido al desconocimiento de los patrones de adaptación de la especie en cuanto a su morfología y estructura interna, lo que implicaría distintas respuestas a las prácticas silviculturales y diferentes niveles de calidad de material cosechable, se investigó varias variables en individuos que estaban bajo un mismo ambiente de sombra y de madurez, por medio de 16 caracteres cuantitativos y 5 cualitativos, los cuales fueron sometidos a análisis univariado, y análisis discriminante canónico.

Los resultados establecen que hay variables que son influenciadas por el ambiente, como son las relacionadas con inflorescencia e infrutescencia, y hay otras que son más estables dentro de las poblaciones, como son el largo de la hoja, el ancho de la hoja y el ancho del foliolo. Estas permitieron diferenciar las poblaciones que se agruparon básicamente en dos grupos. El primero conformado por las poblaciones de Kekoldi, Palma Quemada y La Pacífica y el otro conformado por La Lupe, Santa Rosa y El Salado.

En la segunda parte de la tesis, se realizó la metodología de ADN, para estudios posteriores de biología molecular para aportar a la diferenciación entre las poblaciones de Centro América. En la realización de varios experimentos con diferentes protocolos, se llegó a la conclusión que la metodología en la que se aplicó el protocolo utilizado por el laboratorio de biología molecular de CATIE, denominada CTAB- minipreparaciones permitió la extracción de una mayor cantidad de ADN.

Se concluye que es necesario continuar con estudios de caracterización molecular que corroboren la caracterización morfológica, y además realizar pruebas de progenie que permitan analizar correlaciones entre las variables, bajo un mismo sistema de manejo.

UPEGUI, C. 1998. Morphological characterization of *Quassia amara* in wild populations of Central America to determine its variability. M.Sc. Thesis. Turrialba, Costa Rica, CATIE.

Keywords: *Quassia amara*, descriptors, characterization, histological studies, univariate analysis, canonical discriminant analysis, DNA extraction methodology.

SUMMARY

The Central American and Caribbean regions contain natural forests possessing a rich variety of non-wood products, with potential to contribute to social and economic development in rural areas. *Quassia amara* is a shrub species utilized as a raw material for the production of natural pesticides and medicines.

Due to a lack of knowledge about this species' patterns of adaptation in relation to its internal structure and morphology -- which could translate into distinct responses to silvicultural practices -- a host of plant characteristics were researched from individuals of the same age and growing in similar light conditions. Sixteen quantitative and five qualitative characteristics were measured, and the resulting data were submitted to univariate and canonical discriminant analysis.

Results demonstrate that some morphological characteristics of *Q. amara* are sensitive to environmental conditions (for example, those related to flowering and fruiting), while others were found to be more stable within the distinct populations studied (for example, leaf length and width and leaflet width). These latter variables made it possible to differentiate among populations, which were divided into two basic groups. The first group was comprised of the Kekoldí, Palma Quemada and La Pacifica populations, and the second La Lupe, Santa Rosa and El Salado.

In the second part of the thesis, a DNA methodology was carried out to provide material for latter molecular biological studies to contribute to a genetic differentiation of the Central American populations. After carrying out various experiments with different research protocols, it was concluded that the protocol used by CATIE's molecular biology laboratory, termed CTAB-minipreparations, yielded the largest quantities of DNA.

It is necessary to continue further molecular research to confirm the morphological characterization of the species and carry out progeny tests, which would permit correlations among variables from individuals developing under similar systems of management.

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1	Ubicación geográfica (Latitud y longitud) de los sitios en donde se ubicaron las poblaciones de <i>Q. amara</i> muestreadas.	22
Cuadro 2	Relaciones entre los componentes de varianza: cuadrados medios para arbustos dentro de los lugares (parches) (VARIACION DENTRO) y entre lugares (VARIACION ENTRE) y coeficientes de variación.	36
Cuadro 3	Procedimiento Tukey para hoja.	39
Cuadro 4	Procedimiento Tukey para foliolo.	41
Cuadro 5	Procedimiento Tukey para la inflorescencia.	43
Cuadro 6	Procedimiento Tukey para la infrutescencia	46
Cuadro 7	Significancia del estadístico Lambda de Wilks	47
Cuadro 8	Variación aportada por cada canónico.	49
Cuadro 9	Estructura del canónico.	49
Cuadro 10	Principales características histológicas de la madera.	52
Cuadro 11	Evaluación de tres edades de hoja y dos estados de muestra de un genotipo de <i>Quassia amara</i> para la extracción de ADN.	63
Cuadro 12	ANAVA de la concentración de ADN, en varios genotipos.	64
Cuadro 13	Evaluación de tres edades de hoja y dos estados de muestra de <i>Quassia amara</i> para la extracción de ADN.	65
Cuadro 14	ANAVA de la concentración de ADN, en un solo genotipo.	65

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Forma de las hojas de <i>Quassia amara</i>	6
Figura 2	Flores de <i>Quassia amara</i>	6
Figura 3	Frutos de <i>Quassia amara</i>	6
Figura 4	Ubicación de los sitios de muestreo en Centro América (Costa Rica: Kekoldi, Palma Quemada y La Pacífica, Nicaragua: La Lupe, Honduras: El Salado, Guatemala: San Antonio Cabrera).	22
Figura 5	Formas geométricas que se pueden encontrar en Q. amara que describen la forma de la copa (Leigue 1997).	25
Figura 6	Apariencia de la corteza.	26
Figura 7	Medición del ángulo de inserción del peciolo.	27
Figura 8	Forma del ápice del foliolo	28
Figura 9	Forma de la base del fruto.	31
Figura 10	Forma del fruto.	32
Figura 11	Sección transversal de tallo, parénquima bandeado.	48
Figura 12	Sección transversal, parénquima aliforme.	48
Figura 13	Taponamientos de los vasos.	48
Figura 14	Rayos uniseriados.	48
Figura 15	Discriminante canónico C1, C2 (1=Kekoldi, 2=Palma Quemada, 3=La Pacífica, 4= La Lupe, 5=San Antonio Cabrera, 6=El Salado).	50
Figura 16	Rayos parenquimáticos	51
Figura 17	Comparación de diferentes estados de hoja y de muestra. Hoja joven y adulta (A=adulta, J=joven, I=intermedia, C=congelada, S=silica)	63

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1A	Ubicación de los sitios dentro de las ecoregiones de América Central	76
Anexo 2A	Formulario de recolección de datos de campo	77
Anexo 3A	Formulario de recolección de información histológica	79
Anexo 4A	Pruebas ANAVA del análisis univariado	82
Anexo 5A	Gráficos del análisis univariado	86
Anexo 6A	Resultados del análisis histológico	91
Anexo 7A	Protocolos utilizados la concentración de ADN de <i>Quassia amara</i>	92

1. INTRODUCCION

La región Centroamericana y El Caribe cuenta con bosques naturales que poseen una importante riqueza de productos no maderables del bosque, reconocida en la práctica del aprovechamiento de los recursos naturales no maderables. Un ejemplo lo constituye algunos bosques de El Petén (Guatemala) de los que se extraen recursos para el mercado internacional y local (Villalobos *et al.* 1995).

Por su potencial como generador de empleo e ingresos los productos no maderables pueden ofrecer una opción importante para el desarrollo social y económico en las áreas rurales (Nair 1994).

CATIE, a través del Proyecto de Conservación para el Desarrollo Sostenible en Centro América (Olafo), inició un diseño de modelos de desarrollo basados en el aprovechamiento de la biodiversidad tropical local.

Los objetivos del Proyecto son investigar, validar y difundir modelos sostenibles de sistemas de producción basados en el uso integral de los productos y servicios del bosque. Las acciones del Proyecto se basan en la participación y protagonismo de las comunidades locales, diseñando, en conjunto con ellos, sistemas combinados de manejo de los recursos maderables (tradicionales y no tradicionales) y no maderables e involucrando las instituciones nacionales.

Uno de estos productos no maderables es la *Quassia amara* es un arbusto tropical, utilizado como fuente de materia prima para elaborar insecticidas naturales. Así mismo, es utilizada como planta medicinal, debido a la presencia de metabolitos amargos o cuasinoides (cuasina y neocuasina) en sus tejidos. Debido a estas características, ha sido objeto de una serie de investigaciones por parte de CATIE tendientes a generar criterios para el manejo sostenible de sus poblaciones naturales.

Se desconoce si las poblaciones existentes de esta especie en la región Centroamericana corresponden o no a diversos ecotipos, diferenciables a través de su morfología y fenotipo, que podrían significar diferentes patrones de adaptación al ambiente. Esto, a su vez, podría implicar distintas respuestas a las prácticas silviculturales y diferentes niveles de calidad del material cosechable.

El presente trabajo pretendía determinar si existen aparentes ecotipos de *Q. amara* en base de sus características fenotípicas, midiendo la variabilidad de una serie de descriptores, entre poblaciones establecidas en varios ambientes climáticos y geográficos de la región. Se pretende establecer hipótesis sobre posibles adaptaciones que puedan haber generado las diferencias fenotípicas, en caso de existir.

La caracterización a través de descriptores pretende mostrar un estimado de la variabilidad genética de los genotipos indicando si realmente existen genotipos diferenciables en las ecoregiones de Centroamérica. De la misma manera, se puede evaluar si los descriptores utilizados están siendo efectivos y pueden ser concebidos para otros estudios de la misma especie.

Se realizó un estudio de la estructura interna de la madera para confirmar si hay diferencias histológicas entre las poblaciones. Su importancia radica en que, a pesar que este tipo de estudios es poco frecuente, las diferencias encontradas pueden ser indicadoras de la filogenia de esta especie y ayudar a la conformación de grupos homogéneos entre las poblaciones.

Como parte de este estudio se trató de establecer una metodología de extracción de ADN para realizar estudios con marcadores moleculares, que ayuden en la diferenciación de poblaciones con el propósito de completar la caracterización fenotípica y molecular.

También se colectaron semillas con el objetivo de reproducir los materiales estudiados y poder a través de otras investigaciones confirmar las observaciones y conclusiones emanadas del presente trabajo.

Este trabajo constará de dos partes. En la primera, se tratara la caracterización morfológica e histológica, y la segunda se definira el método de extracción de ADN.

2. OBJETIVO GENERAL

Determinar la variabilidad morfológica de *Quassia amara* como base para una estrategia de conservación de la especie, identificando las diferencias morfológicas entre poblaciones naturales en Centro América, como indicadores de posibles genotipos.

Determinar una metodología para la extracción de ADN, como base para la realización de estudios moleculares posteriores.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Caracterizar *in situ* poblaciones naturales de *Quassia amara* en Centro América, utilizando los descriptores propuestos.

Determinar aquellas características que permitan visualizar la variabilidad genética existente dentro y entre poblaciones.

Recolectar muestras de hojas y tallos, en las diferentes poblaciones, para estudios de estructura interna de la planta, extracción de ADN, futuros análisis químicos y extracción de cuasinoídes.

Realizar un estudio de la estructura interna de la madera de diferentes poblaciones naturales de Q. amara en Centro América, con el fin de conocer su composición y determinar si existen variantes entre dichas poblaciones.

Analizar si las diferencias climáticas y geográficas entre las regiones de estudio interfieren en el fenotipo de la planta. Tratar de relacionar la estructura interna de dichos materiales con las condiciones climáticas y geográficas existentes en las regiones de estudio.

Definir un método de extracción a partir de hojas de Q. amara, que permita la obtención de cantidades significativas de ADN para ser utilizadas en estudios moleculares.

3. HIPOTESIS

Los descriptores pueden usarse como indicadores de genotipos.

Existen diferencias entre poblaciones en las variables estudiadas que tienen que ver con la morfología y la estructura interna entre poblaciones de Q. amara de diferentes regiones fisiográficas de América Central determinadas por condiciones climáticas y geográficas.

Hay diferencias en la efectividad de los métodos de extracción para obtener ADN

4. PARTE I: CARACTERIZACION MORFOLOGICA E HISTOLOGICA

4.1. REVISION DE LITERATURA

4.1.1. *Quassia amara*

4.1.1.1. Descripción botánica

Nombres vulgares: Quassia de Surinam, hombre grande, limoncillo, y palo de hombre

El género *Quassia* pertenece a la subfamilia SIMAROUBOIDEAE, la mayor de las seis que conforman la familia Simaroubeaceae (Thomas 1990). Fue fundado por Linnaeus en la segunda edición de *Species Plantarum*, en 1762 (Cronquist 1944, citado por Ocampo 1995). En 1763, se reconoce como la especie *Quassia amara* L. ex Blom (Ocampo 1995). Según Cronquist 1994, citado por Ocampo 1995, en América el género se caracteriza por ser monotípico.

Es un arbusto erguido de unos 3-6 metros; hojas con el pecíolo y el raquis de los folíolos alados, pinnas acuminadas de 7.5-11cm de largo y 4-7 cm de ancho en su parte media). Flores vistosas de color rosado vivo o rojas, cáliz 2-3mm de longitud, de segmentos ovados, obtusos, ciliados, pétalos glabros, de 2.5-4.5 cm. de longitud linear o linear-lanceolados. Fruto drupáceo oval de 1-1.5 cm de longitud (García 1992).

En las figuras 1, 2 y 3, se puede apreciar en detalle las hojas, las flores y frutos, las cuales son las formas típicas de la planta.



Figura 1. Forma de las hojas de *Quassia amara*



Figura 2. Flores de *Quassia amara*

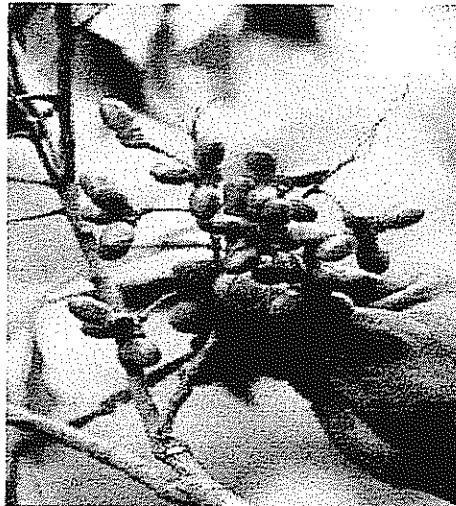


Figura 3. Frutos de *Quassia amara*

4.1.1.2. Distribución natural

Según Cronquist, (1944), resulta difícil determinar con precisión la distribución natural de *Q. Amara*. Se localiza desde el norte de Sur América, hasta el sur de México y las Indias Occidentales. Según Porter (1973), la especie es nativa de América tropical y se presenta desde Brasil hasta México y las Indias Occidentales. Thomas (1990), menciona que existen colecciones que mantienen una distribución continua desde Guyana, Venezuela y Colombia hasta el norte de Nicaragua.

Existen reportes de la presencia de *Q. amara* en el norte de Colombia, en los departamentos de Atlántico, Bolívar, Magdalena y Santander (García 1992); en Panamá, en la zona del canal, Bocas del Toro, Colón, Chiriquí, Veraguas, Coclé, Panamá y Darién en el bosque seco tropical (Croat 1978); en Costa Rica, Nicaragua, Honduras, Salvador, Guatemala y en el sur de México (Porter 1973).

En Costa Rica se determinó la presencia de la especie por debajo de 450msnm en diferentes zonas de vida: bosque húmedo, húmedo tropical, bosque húmedo y húmedo premontano transición a basal y bosque seco tropical. No obstante, la especie se puede establecer de manera artificial por encima de los 500msnm (Ocampo 1995).

Se presenta en todos los niveles de precipitación media anual de las zonas bajas de Costa Rica, excepto en áreas con mas de 5500mm de precipitación media, lo cual se relaciona con limitaciones de drenaje (Villalobos *et al.* 1995). Los sectores con mayor precipitación media presentan las menores frecuencias y densidades. Se sugiere que *Quassia* requiere de un nivel mínimo de disponibilidad de agua en el suelo a lo largo del año por debajo del cual no puede desarrollarse (Villalobos 1995). Así, en zonas con menos de 2500mm, la especie se encontró en bosque de galería de algunos ríos y quebradas. Se presentan mayores densidades en sitios menos lluviosos (Villalobos *et al.* 1995).

Otros factores a considerar para su distribución aparte de la humedad, son la velocidad del viento y la distribución de longitudes de ondas de la radiación solar (Tromp 1990). En el caso de Costa Rica, y el Pacífico seco la escasa presencia de la especie es debida a condiciones de poca humedad. Por otro lado, en la zona Atlántica, el área con mayor disponibilidad de brillo solar y mejores condiciones de drenaje posibilitan la presencia de Quassia (Villalobos 1995).

La capacidad de un individuo para florecer, fructificar y producir una regeneración abundante, si no existen limitaciones de humedad, es mayor en la medida que reciba la luz del sol (Brown 1995). Se pueden encontrar individuos de grandes dimensiones en bosque primario, que a menudo se encuentran aislados o en agrupaciones pequeñas, probablemente por las limitaciones de luz para estimular la floración (Brown 1995). La especie presenta mayores densidades en sitios topográficamente más expuestos a la luz (Ling 1995).

En conclusión, la interacción entre el contenido de humedad de suelo, la disponibilidad de luz dependiendo del clima, la posibilidad de exposición de individuos adultos a la luz solar directa, en función de la dinámica natural del bosque, la composición de la vegetación y las actividades del hombre, determinaría, dentro del ámbito geográfico donde la especie está presente, la ubicación de aglomerados y la densidad de los mismos en un momento dado (Villalobos 1995). En Costa Rica, el principal condicionante de la distribución de Q. amara es la altitud, seguido de la humedad del suelo y el brillo solar. El arbusto suele formar parches de distinto tamaño, con una densidad variable dentro de los mismos en función de condiciones microambientales que se dan en el tiempo (Villalobos *et al.* 1995).

4.1.1.3. Fenología

En cuanto a la estacionalidad, se ha encontrado que existe una relación entre las condiciones de sitio definidas por la iluminación, la topografía y el crecimiento de los individuos. Este último se estima por el incremento en diámetro y en altura, aunque esta no se considera un buen estimador debido a la fragilidad y la tendencia al agobiamiento de esta especie.

El nivel de exposición a la luz de un individuo con capacidad reproductiva, incide sobre la magnitud de su floración y producción de frutos, aunque no sobre la fertilidad de las semillas. La iluminación superior directa sobre un 10 a 80% de la copa, es significativamente más eficiente que sobre el 100%. La actividad reproductiva está determinada por la edad en la que el individuo ha alcanzado un diámetro de 5 cm. a 30cm de altura suelo, la cual se incrementa con la edad (Leigue 1997).

4.1.1.4. Composición química del tallo

La cuasina, la neocuasina y la simalikalactona se encuentran entre los elementos más importantes que posee Q. amara.

La cuasina, según Budavari citado por Cáceres *et al.* (1995), es una alfa lactona muy amarga, soluble en benceno, cloroformo, acetona, y poco soluble en éter; sirve como insecticida y se ha reportado que es un agente bioactivo que inhibe la secreción de la testosterona en células de un tipo de ratas, facilitando un efecto de antifertilidad en estos animales (Njar *et al.* 1995). Es importante resaltar que la cuasina no es tóxica para el hombre (Roak 1947).

El compuesto de simalikalactona posee propiedades como antimalárico (0.02 µg/ml) y antiviral (Cáceres 1995).

4.1.1.5. Utilidad para el hombre

El nombre de *Quassia amara* corresponde a un hombre de Surinam llamado Quassi, que a mediados del siglo XVIII adquirió fama tratando fiebres malignas con un tratamiento secreto. En 1756, se investigaron muestras en Estocolmo y en 1764 aparece la primera referencia de Blom como *Lingnum quassiae*, convirtiéndose en una medicina febrífuga, antidisintérica y tónica muy popular (Busbey 1939). En Estados Unidos, desde 1850, ha sido utilizada como insecticida y en Europa, desde 1880 (Morton 1981).

La parte empleada de este arbusto es el leño o madera, en el que se encuentran los metabolitos de cuasina (adrina), tanino y otros. La cuasina se obtiene amorfa o cristalizada y es de sabor muy amargo (García 1992).

Usos medicinales

La infusión o macerado de la madera se usa como tónico amargo para combatir fiebre, cálculos hepáticos y renales, y aumentar la secreción de las glándulas salivales, los jugos gástricos y biliares (Ocampo y Maffioli, 1987).

Se le atribuyen propiedades amebicidas, antianémica, antiséptica, aperitiva, catártica, colagoga, depurativa, diurética, estomáquica, eupéptica, febrífuga, insecticida, laxante, pediculicida, tónica y vermífuga (Morton 1981). Según Budavari (1989), citado por Cáceres (1995), también se utiliza en la industria farmacéutica como antihelmíntico.

Se usa para la diabetes mellitus (Pittier 1978) y según información de la base de datos de la Universidad de Illinois, citado por Villalobos (1995), es empleada popularmente para problemas hepáticos, picaduras de serpiente, como agente hipoglucémico y antipirético. Sus extractos han mostrado alguna actividad antitumoral, aunque no antimetabólica. Según Polonsky citado por Barbetti et al (1993), también afirma la actividad biológica de la cuasina como una agente antitumoral.

Usos insecticidas

Toda la planta tiene actividad insecticida. El extracto acuoso de la madera actúa como veneno de contacto contra *Acyrtosiphum pisum*, *Aphis dabae*, *Bombyx mori*, *Chaitophorus populicola*, *Hoplocampa flava*, *H. minuta*, *Macrosiphum ambrosiae*, *M.liriodendri*, *M. rosae*, *Phyllaphis fagi*, *Phymatocera aterrima* y *Porosagrotis orthogonia* y el extracto de la raíz contra *Attagenus piceus* y *Diaphania hyalinata* (Grainge y Ahmed 1988). Se ha reconocido ampliamente la efectividad de extractos de *Q. amara* aplicados contra larvas de *Hoplocampa* sp. en melocotones (Hohn *et al.* 1996).

Quassia produce un veneno paralizante que actúa por contacto y por ingestión. Su aplicación no elimina los insectos pero detiene su desarrollo y provoca rechazo. Su aplicación no afecta a los insectos útiles como abejas (Aphidae), y mariquitas (Coccinellidae), sino que actúa fundamentalmente contra insectos succionadores (Stoll, G. 1989).

Otros usos

La madera se usa para fabricar papel matamoscas y cajas para proteger la ropa de polilla (Williams, L. 1981). Según Budavari 1989, citado por Cáceres (1995), también se utiliza en la producción de licores como imitador del lúpulo.

4.1.2. Caracterización

La estimación de la variación de la genética cuantitativa de los caracteres permitirá la toma de decisiones en el mejoramiento de una especie y de la estimación de la importancia de la variación desde el punto de vista ecológico dentro de la extinción de especies (Storfer 1996).

La caracterización consiste en la toma de los datos, principalmente cualitativos, que permiten describir y en consecuencia diferenciar accesiones de una misma especie (Querol 1992).

La caracterización del germoplasma considerado, como "recurso fitogenético". Representa una actividad muy importante, que permite la valoración de una serie de características cualitativas y cuantitativas que permiten la selección de los materiales y su posterior utilización en programas de fitomejoramiento o de otra naturaleza (Clement 1986).

Es un proceso que se inicia con la colección o introducción, y debe finalizar con la publicación y la difusión de la información y de material vegetal junto con la semilla para que pueda ser utilizada por los usuarios. El objetivo principal de la caracterización es describir y dar a conocer el valor del germoplasma. Los objetivos más específicos son 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).

Las especies que no han sido mejoradas, mantienen la diversidad, la variabilidad genética el nivel de adaptación a los sitios (Contreras 1992).

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

Los descriptores de caracterización permiten una discriminación fácil y rápida entre fenotipos. Generalmente, son caracteres altamente heredables, pueden ser fácilmente detectados a simple vista y se expresan igualmente en todos los ambientes. Además, pueden incluir un número limitado de caracteres adicionales que son deseables según el consenso de los usuarios de un cultivo en particular (IBPGRI 1995).

Los descriptores que están afectados por el medio ambiente y que son persistentes pueden ser importantes agronómicamente (Ortiz y Sevilla 1997).

Los descriptores muestran continuas variaciones, 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).

Existen tres vías para disminuir el efecto del ambiente y la interacción fenotipo-ambiente: 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 (Goodman y Paterniani 1969).

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 1988).

Los principales datos para caracterización de manera general son: características de la planta, hojas, flor, fruto, semilla y las partes subterráneas. Por ejemplo, en la planta se toma en cuenta, la altura, forma, hábito de crecimiento y ramificaciones; en hojas: forma, ancho, longitud, color, tipo de borde y nervaduras, en la flor se considera forma, color, tipo de cáliz. En el fruto sería por ejemplo forma, color, volumen, número de semillas por fruto y en la semilla y las partes subterráneas la caracterización se basa en la forma, el tamaño y el color (Querol 1992).

El IBPGR usa las siguientes definiciones en la documentación de los recursos genéticos (IBPGR 1985):

- i) Pasaporte (identifica la accesión e información recolectada por los colectores)

ii) Caracterización (consiste en grabar algunas de las características que son altamente heredables, que pueden ser observadas a simple vista en todos los ambientes)

iii) Evaluación preliminar (consistente en la recolección de un número adicional de rasgos que se piensen sean desarrollados en consenso con usuarios de un cultivo en particular).

La caracterización y evaluación preliminar será responsabilidad de los curadores, mientras que la caracterización futura y la evaluación debería ser realizado por un especialista en mejoramiento. Los datos de la evaluación futura deberían ser entregados a un recolector, que debe ser el que mantenga los datos en un archivo.

Siguiendo con las normas internacionales aceptadas, los estados de un descriptor se indican de la siguiente manera:

Las medidas estarán hechas en unidades métricas.

Los descriptores que se observan se registran en una escala de 1-9. Algunos autores describen solamente una selección de los estados, por ejemplo 3, 5 y 7 para algunos descriptores. En este caso, el rango de códigos está disponible para usarse por extensión de los códigos dados o por interpolación entre ellos. Ejemplo en 8. (susceptibilidad a plagas y enfermedades) 1 corresponde a susceptibilidad extremadamente baja y 8 susceptibilidad extremadamente alta.

La presencia o ausencia de caracteres está registrado como + (presencia) y 0 (ausencia).

Para descriptores que no son generalmente uniformes a través de la accesión, (por ejemplo la colección mixta o la segregación genética) la media y la desviación standard pueden ser reportadas en el caso que el descriptor es continuo o la media y "X" si es discontinuo.

Si el descriptor no es aplicable, se usa el "0" como valor del descriptor. Por ejemplo, si una entrada no formara flores, se colocaría el 0. Si la información no está disponible se coloca un espacio vacío.

Para el color se utilizan las tablas de color estandarizado, por ejemplo la del Royal Horticultural Society Color Chart, Methen Handbook of Colour, Munsell Color Charts for Plant Tissues (la tabla usada puede ser especificada en una nota como descriptor adicional). Se recomienda para los caracteres de colores no estandarizados.

Se debe tener en cuenta que las variaciones debidas al ambiente pueden dar como resultado modificaciones en el fenotipo, sin que esto implique cambios en el genotipo de las plantas (Okada 1991). Por lo tanto, los individuos seleccionados para la caracterización, deben tener condiciones de homogeneidad en todos los sitios del muestreo, para asegurar la presencia de ecotipos de la especie.

4.1.3. Colección de germoplasma

La variación genética acumulada en todos los organismos vivos sobre la tierra durante aproximadamente tres mil millones de años de evolución biológica, constituye los recursos genéticos de nuestro planeta. Esta diversidad actúa como amortiguamiento de los cambios climáticos y ambientales. Por ello, es esencial el mantenimiento de la estabilidad y el balance biológico de la biosfera (Palmberg y Esquinas 1990).

La conservación de recursos genéticos debe considerar la variación a nivel de especie y la diversidad dentro de cada especie; por lo tanto, debe realizarse de

acuerdo con la distribución y variación natural de la especie a conservar (FAO 1998).

La conservación de los recursos genéticos forestales consiste en mantener una reserva de material en estado natural, a la cual se pueda recurrir en caso de que se necesite introducir nueva variación en la población de mejoramiento (Mesén 1994).

La colección de germoplasma se realiza con el fin de cumplir cualquiera de los siguientes objetivos: 1) La conservación de la diversidad de la especie, para evitar su pérdida en un proceso denominado "erosión genética". En este caso, es necesario recoger la diversidad y conservarla en forma de semillas en condiciones ambientales controladas, para evitar la pérdida de su poder germinativo. 2) La obtención del germoplasma para usarlo en el mejoramiento genético (Sevilla y Holle 1995).

Para el IPGRI, la colecta de germoplasma se hace con el objetivo de prevenir la erosión genética, y la extinción de las especies, o por la necesidad de uso inmediato de germoplasma para propósitos de productividad.

Otras justificaciones es la utilidad para plantar junto con las comunidades cultivos no tradicionales como los árboles de multipropósito, frutos silvestres, especies medicinales y especies importantes en el manejo de la restauración del habitat, coleccionar también material y conservarlo de manera ex situ para tener preservado material de las poblaciones originales y mantener la diversidad de los genotipos (IPGRI 1996).

Para la colecta de material se requiere planificar la expedición, para lo cual se necesita estudiar la información relevante sobre las especies a recolectarse, sobre la región que se explorará. La consulta de material de herbario es de particular valor para visualizar la variabilidad de las especies y su distribución geográfica. Un

estudio detallado de mapas, relieve, red hidrográfica, distribución de poblados, infraestructura vial, clima y vegetación ayudará a su vez a planear correctamente la expedición (Okada 1991)

4.1.4. Histología

Mediante estudios de la estructura interna de la planta se pueden comprender los procesos fisiológicos y bioquímicos que se producen en su interior, también es posible establecer relaciones filogenéticas entre los distintos grupos de plantas (Vásquez 1995). A través de la estructura de la madera, es posible observar variación en las especies, permitiendo agrupar entre especies (Cutler 1978).

En la mayoría de las plantas con crecimiento secundario, que crecen en regiones tropicales, la actividad cambial se da a lo largo de toda su vida es decir, las células cambiales se dividen periódicamente y las resultantes sufren una diferenciación gradual para formar los elementos del xilema y del floema. El xilema que se produce durante un período de crecimiento constituye una capa de crecimiento. En las secciones transversales de tallos y raíces, estas capas son designadas anillos de crecimiento (Flores 1994).

Los anillos suelen presentarse bien definidos en las zonas templadas, debido a que pueden observarse anillos de crecimiento anuales, y en algunos casos hay presencia de dos anillos al año, como en la especie *Tamarix aphylla*. Los anillos anuales son visibles gracias a las diferencias estacionales que existen en la cantidad y la forma de algunas células que se desarrollan del cambium (Fahn 1974).

La causa determinante de la visibilidad de las capas de crecimiento en una sección de leño, es debida a la diferencia estructural entre el xilema que se produce al principio y al final de la temporada de crecimiento (Flores 1994).

De esta manera, se puede observar que los elementos traqueales formados al inicio de la época de crecimiento (primavera), son usualmente más largos y tienen paredes más delgadas, que aquellos que se desarrollan más tarde.

Los primeros reciben el nombre de madera temprana o leño de primavera y los segundos de madera tardía o leño de verano (Flores 1994).

Los anillos de crecimiento pueden presentar variación de acuerdo a la humedad y al ambiente en que se presentan; en lugares con humedad del suelo adecuada, pueden ser anchos y mostrar poca variación de un año para otro, aunque se debe tener en cuenta el ancho que se obtiene debido a la edad. En los lugares áridos y semiáridos, son estrechos y muestran una clara variación en el ancho (Fahn 1974).

El ancho de los anillos de crecimiento esta muy influido por las condiciones ambientales externas, y es, por consiguiente, variable. Un árbol que se desarrolle en condiciones uniformes presenta los anillos concéntricos, pero factores de naturaleza mecánica, química y fisiológica pueden determinar un crecimiento excéntrico, a veces tan pronunciado, que parte de las capas no se disponen completamente alrededor del eje. En las plantas en las que no se presenta esta situación, se puede observar la ausencia de anillo de crecimiento. (Fahn 1974).

En climas templados cálidos, el porcentaje de árboles sin anillos es aún menor. En plantas que crecen en regiones con climas estacionales bien definidos, el cambium cesa su actividad cuando hay condiciones desfavorables; en el otoño suspende la actividad y entra en un estado de latencia que puede durar desde el final del verano hasta la primavera siguiente. (Fahn 1974).

Se sugiere que la producción de células del cambium está estrechamente relacionada con la actividad estacional. La típica porosidad del anillo se produce

en plantas previamente adaptadas al clima tropical y que se enfrentan a un clima de inviernos fríos y con alternancia de estaciones secas y húmedas (Fahn 1974). Entre los factores que influyen en la actividad del cámbium se considera las sustancias reguladoras de crecimiento o un cierto nivel de ellas (según Gouwentak 1941, citado por Fahn 1974). Sin embargo, en la mayoría de las plantas debe completarse un corto periodo de latencia antes de que el cámbium pueda reactivarse con la aplicación de reguladores de crecimiento. Y con el aumento de la longitud del día. No obstante, tienen efectos en la actividad cambial factores externos e internos (Waisel y Fahn 1965b, citados por Fahn 1974). El crecimiento estacional puede ser interrumpido debido a condiciones climáticas adversas, enfermedades u otros agentes (Flores 1994).

4.1.4.1. Albura y duramen

La albura y el duramen son otras características importantes de la madera. Muchas de las diferencias entre ellas son de índole química. Con el tiempo, la madera pierde agua y parte de las sustancias almacenadas, acumulando posteriormente compuestos orgánicos como aceites, resinas, gomas, taninos, sustancias aromáticas y pigmentos. Estos compuestos son removidos de las zonas de crecimiento y transportados hacia el duramen, debido a que pueden ser tóxicos inhibidores para las células vivas. Su movilización se efectúa a través de los rayos. Estos cambios afectan la consistencia del duramen pero, a su vez, lo convierten en un elemento más duradero que la albura, menos atacable por los microorganismos y menos penetrable por los líquidos (Flores 1994).

4.1.4.2. Vasos

En cuanto a la distribución de los vasos, en el caso en que estos sean del mismo diámetro y estén uniformemente distribuidos en el anillo de crecimiento, la madera se denomina porosa difusa; la madera provista de vasos de diámetros desiguales, con los vasos mayores localizados en la madera temprana, se llama porosa anular, por la distribución circular de los grandes vasos en las secciones

transversales del xilema. Sin embargo, la distribución de los vasos puede variar según las condiciones ambientales y la edad del árbol (Flores 1994).

4.1.4.3. Distribución del parénquima xilemático

Existen dos tipos básicos de distribución del parénquima. Uno se denomina parénquima apotraqueal, y se caracteriza por la posición independiente del parénquima de los vasos. El otro, presenta las dos clases de elementos asociados topográficamente de una manera definida, y se denomina paratraqueal. Ambos tipos de distribución pueden tener contacto en el tejido (Flores 1994).

Cada uno de estos tipos presenta varios subtipos. Así, el parénquima apotraqueal puede estar disperso por todo el anillo de crecimiento (parénquima difuso), o en forma de agregado (difuso agregado), presentarse ordenado en bandas (parénquima bandeado), o bien cuando está en zona terminal de un periodo de crecimiento (parénquima terminal).

El parénquima paratraqueal puede ser escaso, unilateral, vasicéntrico, aliforme, aliforme confluyente o bandeado confluyente (Flores 1994).

Las diferencias fisiológicas son debidas a la movilización de carbohidratos almacenados en la primavera. En el parénquima paratraqueal la movilización es primero en éste al comenzar la primavera (Flores 1994).

4.2. MATERIALES Y METODOS

4.2.1. Localización

Se realizaron las observaciones de los descriptores en los países de América Central, Costa Rica, Nicaragua, Guatemala, y Honduras, en poblaciones naturales y ubicados en las diferentes ecoregiones, en donde existían reportes de herbarios acerca de la presencia de *Quassia amara*. La ubicación de los sitios de muestreo

de acuerdo a las coordenadas geográficas se encuentran en la figura 4 y cuadro 1. La ubicación de los sitios dentro de las ecoregiones de América Central se encuentra en el anexo A1.

4.2.2. Muestreo

Para la toma de datos de los descriptores propuestos, se realizó un muestreo por conglomerados en cada sitio de muestra trazando una línea, luego se ubicaron cuatro transectos a corta distancia sobre los cuales se trazó un rumbo al azar, y se ubicaron tres plantas (parche), que tuvieran la condición de tener 5 cm de diámetro, o más, a 30 cm del suelo (tamaño considerado como límite inferior de madurez sexual (Leigue 1997)). En cada sitio se tomaron un total de 12 individuos. El presente estudio se realizó tomando en cuenta que la unidad muestral es cada arbusto de *Quassia amara*, al que se le tomaron los datos de descriptores cuya descripción se encuentra en el siguiente acápite.

4.2.3. Caracterización fenotípica de campo

Se realizó la siguiente toma de datos del lugar y del fenotipo de los árboles:

Datos de introducción

- Nombre científico
- Fecha de medición
- Mes
- Año
- Caracterización y evaluación preliminar
- Datos del sitio
- Número de referencia del arbusto que se colectó
- Persona que colectó material o información

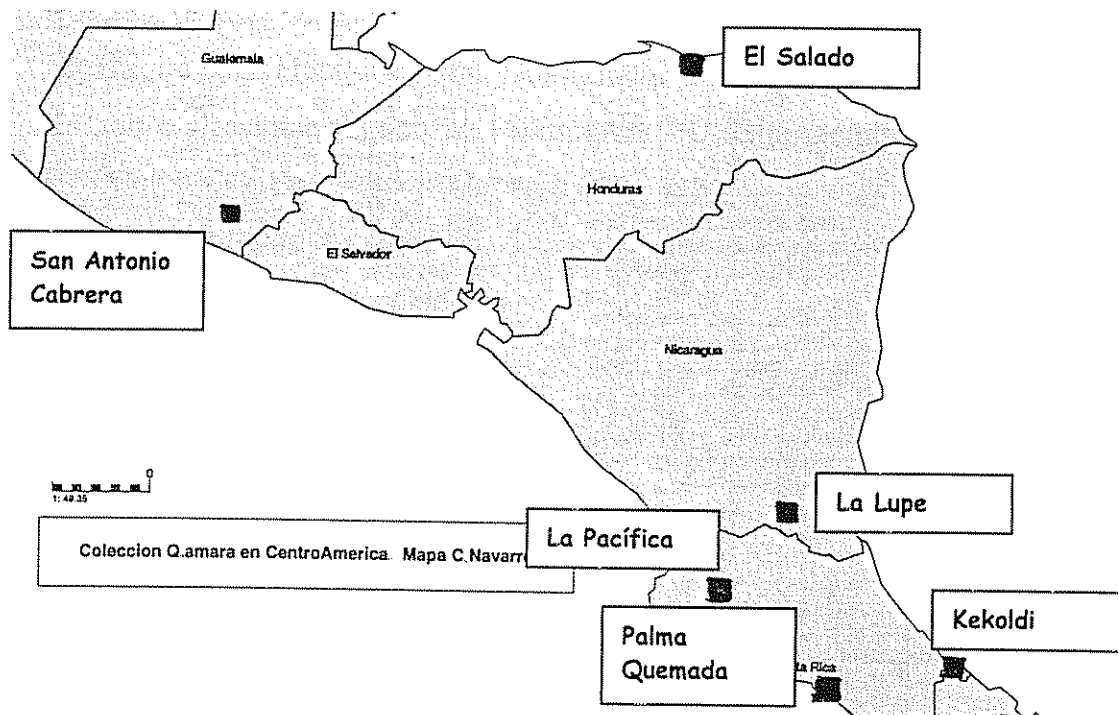


Figura 1. Ubicación de los sitios de muestreo en Centro América (Costa Rica: Kekoldi, Palma Quemada y La Pacífica, Nicaragua: La Lupe, Honduras: El Salado, Guatemala: San Antonio Cabrera).

Cuadro 1. Ubicación geográfica (Latitud y longitud) de los sitios en donde se ubicaron las poblaciones de *Q. amara* muestreadas.

PAIS	DPTO/ PROVINCIA	MUNICIPIO/ CANTON	CASERIO/ LUGAR	LONGITUD	LATITUD
Costa Rica	Limón	Baja Talamanca	Kékoldi	-82.76666	9.63333
Costa Rica	Puntarenas	Savegre	Palma Quemada	-84.05916	9.47723
Costa Rica	Guanacaste	Cañas	La Pacífica	-85.11666	10.46666
Nicaragua	Río San Juan	El Castillo	La Lupe	-84.43055	11.12500
Guatemala	San Antonio Cabrera	San Juan Tecuaco	San Antonio Cabrera	-90.25000	14.06600
Honduras	Colón	Limón	El Salado	-85.45000	15.80000

- País en el cual se realizó la colección de la información (Costa Rica.CRI, Nicaragua.NIC, Honduras.Hon, Guatemala. GUA)
- Estado o Provincia (Limón LI, Puntarenas PU, Guanacaste GU, El Castillo EC, Colón CO, San Antonio Cabrera SR)
- Latitud del sitio de la colección
- Longitud del sitio de la colección
- Altitud del sitio de la colección
- Topografía del sitio de colección
- Tipo de vegetación
- Fecha de floración (Día, mes, año)
- Fecha de fructificación (Día, mes, año)

Datos de la planta

- Diámetro del arbusto
- Altura
- Forma de la copa

Características cuantitativas

- Largo de la hoja
- Ancho de la hoja
- Largo del folíolo
- Ancho del folíolo
- Número de folíolos por hoja
- Angulo de inserción de la hoja y del pecíolo foliar
- Presencia o ausencia de frutos
- Número de frutos solitarios
- Número de frutos en racimo
- Longitud del fruto
- Diámetro del fruto

Características cualitativas

- Forma de la copa
- Textura del folíolo
- Forma del folíolo
- Color del folíolo
- Pubescencia de la hoja tanto en haz como en envés
- Forma del ápice de la hoja
- Forma del fruto
- Forma de la base del fruto
- Rugosidad de la corteza

4.2.3.1. Descriptores de sitio

Topografía del sitio de colección IPGRI

- 1 = plano 0-3
- 4 = ondulado 3-10
- 5 = quebrado 11-15.9%
- 6 = colinado 16-30%
- 7 = fuertemente socavado >30% moderada variación de elevaciones
- 8 = montañoso >30% grandes variaciones de rango alto de elevación (>300m)
- 9 = otro

Vegetación (Ocampo 1995)

- 1 = bosque
- 2 = bosque secundario
- 3 = tacotal
- 4 = cacao abandonado
- 5 = cacao
- 6 = huerto
- 7 = potrero

4.2.3.2. Descriptores del arbusto

Diámetro

Se mide a la altura de 30 cm, con un vernier, y se toman dos medidas en mm, en cruz, para calcular el promedio. Si hay más de un eje, se calcula el diámetro cuadrático medio del individuo (se elevan al cuadrado los diámetros y se saca la raíz cuadrada del producto).

Descripción de la copa

Se define de acuerdo a la forma geométrica que presenta cada individuo según Leigue (1997) (redonda, elíptica, cilíndrica, en triángulo invertido o agrupada), la cual describe una copa dividida en grupos de follaje alrededor de cada eje. Ver figura 5.

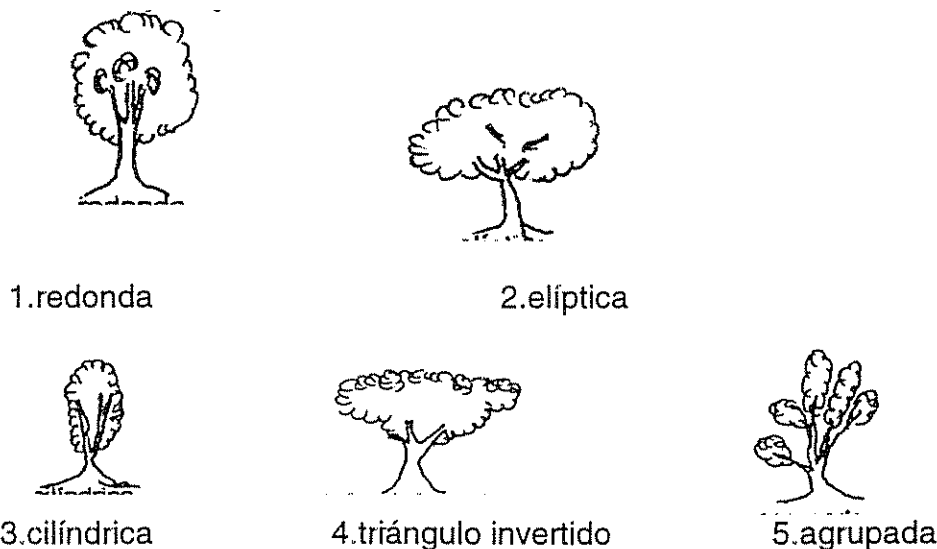


Figura 5. Formas geométricas que se pueden encontrar en *Q. amara* que describen la forma de la copa (Leigue 1997).

Color de la corteza

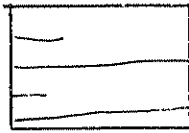
Se toma el color que presenta la corteza en tallos de 1,5 cm de diámetro, que son parte de la colecta. Como condición deben tener 1.5 cm en el punto en que se tome. El color se toma con base a la tabla de colores de Munsell.

Color de la rama joven

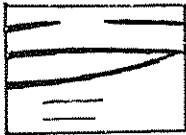
Se toma el color según tabla de colores Munsell de la rama lateral pequeña, definida como la parte del tallo en la cual no se ha formado corteza y se toma del tercio superior donde hayan hojas jóvenes.

Apariencia de la corteza

Se toma en tallos de 1,5 cm de diámetro, de los que fueron colectados, en 1 cm cuadrado de área. De acuerdo a la figura 6, se considera lisa, si no tiene ninguna rugosidad, sublisa si tiene menos de un 50% de rugosidad y rugosa si es más de un 50% aproximadamente.



1 Lisa



3 Sublisa



5 Rugosa

Figura 1. Apariencia de la corteza.

Altura

Se toma la medida desde la base del arbusto con una vara telescópica, hasta la punta de la copa.

4.2.3.3. Descriptores de hojas

Angulo de inserción del peciolo

Se mide utilizando un compás, determinando el ángulo que se forma entre el peciolo y el eje central. El compás se coloca sobre el eje, y luego se observan los grados de apertura hasta el centro del peciolo, y se determina el ángulo en grados. Las observaciones se realizan en las 10 hojas muestreadas.



Figura 7. Medición del ángulo de inserción del peciolo.

Largo de la hoja

Para las mediciones se toman diez hojas maduras del tercio superior, a las cuales se les mide su longitud con una regla, desde la parte proximal hasta el ápice del foliolo terminal.

Ancho de la hoja

Se considera la distancia en mm que hay entre los ápices de los dos folíolos centrales, en hojas de 7 folíolos o en los dos folíolos extremos cuando la hoja tiene 5 folíolos.

Número de folíolos por hoja

Se cuentan todos los folíolos presentes en cada una de las 10 hojas muestreadas.

Largo del folíolo

Desde la base del peciolulo, o sea la parte proximal del foliolo, hasta el ápice foliar con una regla en mm. Se toma la medida a los 20 folíolos

Ancho del folíolo

De la parte más ancha de cada una de las hojas muestreadas se mide el ancho con una regla en mm. La medida se realiza en 20 folíolos.

Pubescencia de la hoja en haz

Se califica en los 20 folíolos muestreados, observando a simple vista.

Pubescencia de la hoja en envés

Se califica en los 20 folíolos muestreados, observando a simple vista.

Forma del ápice del folíolo

Se califica de 1 o 2, según el desarrollo de la punta. Se toma de 10 folíolos de las hojas muestreadas.

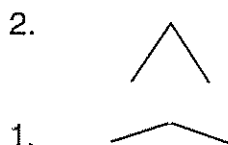


Figura 8. Forma del ápice del folíolo

Margen del folíolo

Se observa a simple vista si el borde del folíolo era liso o ondulado. Se toma en los 10 folíolos de las 10 hojas muestreadas.

Textura del folíolo

Se califica 20 folíolos al tacto, siendo el 3 blanda, y el 7 coriáceá (si era dura).

Color del folíolo

Se toma según tabla de colores de Munsell, a la misma hora del día, y bajo una misma sombra. Este parámetro se observa en todas las hojas.

4.2.3.4. Descriptores de la flor

Epoca de floración

Según lo que se observa en los sitios de muestreo y con base en la información que pueden brindar los conocedores del lugar.

Largo del pedúnculo o eje central

Se mide con una regla en mm desde la parte proximal al tallo hasta la base de la flor distal.

Color de la flor

Según tabla de colores. Se mide en flor fresca, a las 10 flores que se muestrean.

Ancho de la flor

Se mide el diámetro en mm con regla, a 10 flores ubicadas en la parte basal, que están abiertas.

Largo de la flor

Se toma en mm con regla, a 10 flores ubicadas en la parte basal, que están abiertas. En las mismas flores en que se toma el ancho.

Número de pedicelos por flor

Se toma el dato dentro de una inflorescencia y se determina cuantas flores están ausentes y las presentes.

Número de flores por racimo

Se toman las presentes en todo el racimo.

4.2.3.5. Descriptores del fruto

Epoca de fructificación

Con base en la información que puedan brindar los conocedores del lugar.

Presencia o ausencia de frutos

Si se encuentran, tiene una clasificación de uno, y si no se encuentra es cero.

Número de frutos en racimo

Se evalúan los frutos que están en 10 racimos. De esta manera, se consideran todos los que están dentro del ginóforo, ya sea desarrollados, abortados, o que dejaron cicatriz.

Número de frutos por ginoforo

Se escogen al azar 10 ginoforos dentro de la infrutescencia y se procede al conteo de frutos.

Número de frutos abortados

Se observarán las cicatrices en el ginoforo de frutos que no fueron desarrollados, en los cuales se nota la cicatriz cerrada que queda cuando el fruto es abortado.

Color del fruto

Según tabla de colores Munsell, a los frutos que se consideran maduros por su consistencia al tacto, la cual es blanda y el pericarpio es fácil de extraer, y su color entre negro y verde.

Color del ginoforo

Se escogen al azar 10 ginoforos, a los cuales se les evalúa su color de acuerdo a la tabla de colores de Munsell.

Longitud del fruto

Se toma la longitud de los frutos con ayuda de un vernier.

Diámetro del fruto

Se toma en 10 frutos, con un vernier.

Forma de la base del fruto

Se determina la forma de la base del fruto de acuerdo a la figura 9. Las observaciones se hacen en 10 frutos. Se desprende el hipantio, y se observa si cumple con las condiciones de ser hundida (1), aplanada (2), inflada (3), puntiaguda (4).



1 hundida



2 aplanada



3 inflada

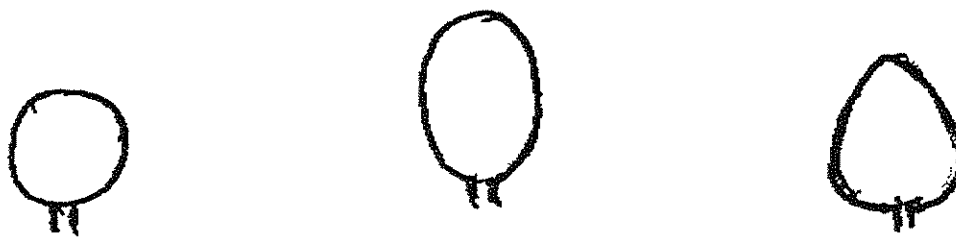


4 puntiaguda

Figura 9. Forma de la base del fruto.

Forma del fruto

Se califica en los 10 frutos observados con la clasificación de esferoide (1), elipsoide (2) y ovada (3) (ver figura 10).



1. esferoide

2. elipsoide

3. ovada

Figura 10. Forma del fruto.

4.2.3.6. Formulario de campo

El formulario usado para la toma de los datos de campo, se presenta en el Anexo 2.

4.2.4. Caracterización histológica

Los estudios de anatomía interna se realizaron en el laboratorio de histología del CATIE; Turrialba, durante los meses de Agosto y Septiembre, a partir de las muestras colectadas durante la caracterización de *Quassia amara* en las poblaciones silvestres de Centro América.

De las localidades visitadas se tomaron muestras de árboles en Costa Rica (Kekoldi, Palma Quemada, La Pacífica), Nicaragua (La Lupe), Honduras (El Salado) y Guatemala (San Antonio Cabrera).

Cada sitio estudiado, se dividió en cuatro parches, y de cuatro arbustos que estaban creciendo a la sombra dentro del parche, se recolectaron muestras de tallo de aproximadamente 1 a 2cm de ancho, y 1cm de largo. Dichas muestras se

traieron al laboratorio empacadas en bolsas plásticas y seguidamente se realizaron cortes de aproximadamente 25 μ m de grosor, utilizando para ello un micrótomo para maderas.

Estos cortes fueron deshidratados con FAA (Formaldehído, ácido acético, alcohol), durante 48 horas, seguidamente se deshidrataron en una serie ascendente de etanol (50, 70, 80, 90, 95, 100, 100), durante 30 minutos en cada uno de ellos. Se aprovechó esta deshidratación, para de una vez colorear los cortes. De esta manera, se colocó safranina al 1% dentro del alcohol de 70, así como Fast green dentro del de 100. Una vez que se tiñó y pasó de nuevo por alcohol de 100, se colocaron en una mezcla 1:1 de alcohol de 100- xileno, para dejarlas finalmente en xileno. Seguidamente se colocaron en portaobjetos, donde se les adicionó Permout como sellador y se les colocó el cubreobjetos.

Para los estudios de estructura interna se realizaron observaciones de diferentes características al interior del tejido, las cuales al igual que la manera como se realizó la toma de información, se encuentra en el Anexo 3.

Las principales variables evaluadas fueron:

- Características de la corteza
- Presencia o ausencia de anillos de crecimiento
- Distribución de los elementos conductores (vasos)
- Tipo de parénquima axial
- Tipo de rayo
- Presencia o ausencia de taponamiento en los elementos conductores
- Promedio de vasos por parche.

Para ello se realizaron observaciones en tres placas conteniendo tres cortes diferentes, de tal manera que se evaluaron tres cortes de tres diferentes arbustos de cada parche.

Todas las observaciones se realizaron bajo un objetivo de 10X; con excepción de la determinación del promedio de vasos en cada muestra, que se realizó bajo un objetivo de 25 X. En este último caso se realizaron 10 muestreos aleatorios de donde finalmente se obtuvo el promedio.

4.2.5. Análisis estadístico de los resultados

4.2.5.1. Análisis univariado

Se obtuvieron las estadísticas descriptivas de los caracteres cuantitativos para cada uno de los arbusto estudiados, estimándose los siguientes parámetros: medias, desviación estándar, coeficiente de variación, valor mínimo y valor máximo. Para las variables cualitativas se empleó como medida de tendencia central el valor de más frecuente ocurrencia (moda). Se analizó el ANAVA, además se realizaron los gráficos correspondientes para analizar cada una de las características o variables analizadas.

4.2.5.2. Procedimiento w de Tukey

Este tipo de prueba se realizó a los promedios tomados de las características que están constituidas dentro de un análisis univariado, y los resultados que se obtuvieron con este procedimiento se encuentran después de cada uno de los análisis de las características estudiadas.

4.2.5.3. Prueba Chi-cuadrado

Se realizó dicha prueba para la características cualitativas como evidencia de anillos de crecimiento, distribución de los taponamientos (distribución de los vasos), poco taponamiento, presencia del tipo de parénquima axial.

4.2.5.4. Prueba F

Se realizó dicho análisis para determinar si el número de vasos es una característica diferente entre las poblaciones de *Quassia amara*.

4.2.5.5. Analisis multivariado con discriminante canonico

Con la lista de descriptores definida se pueden empezar a examinar las poblaciones y sus relaciones. En esta parte del estudio, se analizan las relaciones feneticas entre poblaciones para determinar una filogenia preliminar (Clement 1986).

Para la prueba de comparación múltiple entre lugares, se usó el análisis multivariado con discriminante canónico, para identificar cuales características maximizan las varianzas entre lugares, esto se realizó mediante procedimiento SAS. En los análisis de las características cuantitativas y cualitativas, se tomaron como referencia los datos de los arbustos estudiados, en todos los lugares, y en todos los parches. Lo primero que se hizo, es encontrar las medias en caso de las características cuantitativas, y la moda en el caso de las características cualitativas.

Discriminante canónico

El análisis discriminante canónico permite explicar la pertenencia de un individuo a un grupo mediante el ajuste de funciones de variables continuas. Establece una relación lineal entre un grupo de variables que representan las diferencias de las medias de grupos y las variables dependientes. El modelo de análisis discriminante se basa en el cumplimiento de las siguientes suposiciones: unidades experimentales que sean estadísticamente independientes una de otra y que dentro de cada grupo, el grupo de variables predictoras (independientes), tenga distribución normal multivariada (Hamer 1996).

Se realizó un análisis multivariado, y una prueba múltiple entre lugares, que permitió el análisis de varias variables al mismo tiempo, las cuales identificaron las características que maximizaron las varianzas entre lugares, y las diferencias entre las poblaciones estudiadas. Debido a que las poblaciones ya estaban identificadas, no se realizaron análisis de agrupamiento o matrices de distancia.

4.3. RESULTADOS Y DISCUSION

4.3.1. Comportamiento de las variables

4.3.1.1. Variables morfológicas

Se obtuvieron las relaciones entre los componentes de varianza, de los caracteres de hoja y de foliolo en los arbustos estudiados de todas las poblaciones, encontradas en los países de Centro América, también se observan estos componentes, para los datos de inflorescencia e infrutescencia, pero solo para las poblaciones ubicadas en Kekoldi, Palma Quemada y La Lupe (Cuadro 2).

Cuadro 2. Relaciones entre los componentes de varianza: cuadrados medios para arbustos dentro de los lugares (parches) (VARIACION DENTRO) y entre lugares (VARIACION ENTRE) y coeficientes de variación.

FUENTE DE VARIACION	VARIACION DENTRO	VARIACION ENTRE	VALOR F Parche	VALOR F lugar	Coefficiente de variación
Angulo de inserción de hoja	956.1	3642.8	2.45*	9.33**	30.82
Largo de la hoja	15011	160054	11.72**	124.97**	12.33
Ancho de la hoja	14704	121694	6.06**	50.19**	23.36
Angulo de inserción del foliolo	32.4	91.1	2.23NS	6.25**	7.33
Largo del foliolo	386.1	3012.2	3.32**	25.90**	8.54
Ancho del foliolo	89.8	296.5	3.18*	10.50**	11.34
Largo del pedunculo	12597.5	18040.1	1.65NS	2.36NS	39.40

FUENTE DE VARIACION	VARIACION DENTRO	VARIACION ENTRE	VALOR F Parche	VALOR F lugar	Coefficiente de variación
Total del número de pedicelos	402.9	495.7	7.56**	9.30**	31.60
Pedicelos presentes	56.1	941.5	1.13NS	18.90**	57.31
Pedicelos ausentes	335.9	120.4	5.55**	1.99NS	72.04
Total de ginoforos	2.5	2.3	1.68NS	1.54NS	57.89
Frutos por ginoforo	0.8	3.4	0.90NS	3.65NS	21.13
Frutos ausentes	1.7	24.1	1.17NS	15.90**	68.07
Frutos presentes	1.79	23.7	1.33NS	17.58**	81.83
Frutos abortados	2.8	15	2.36NS	12.34**	79.99

**Diferencia significativa al nivel probabilidad $(1-\alpha)=0.95$

* Diferencia significativa al nivel probabilidad $(1-\alpha)=0.90$

NS diferencia no significativa

Los análisis de varianza se encuentran en el Anexo 4. Se realizaron los gráficos para el análisis de cada una de las características, los cuales se encuentran en el Anexo 5. El procedimiento Tukey se encuentra bajo cada una de las partes de la planta que se analizaron.

HOJA

Angulo de inserción

Se presenta una alta variación entre los lugares muestreados, y una variación menor dentro de los lugares dentro de un mismo parche. Los lugares que presentan una mayor variación son Palma Quemada, La Pacífica, San Antonio Cabrera y El Salado.

Aunque no se puede comprobar con datos y análisis estadísticos, se observó que donde había mayor ventilación, mayor luminosidad y menor humedad de suelo el

ángulo promedio de inserción era mayor. La aparente sensibilidad de esta característica a las condiciones microambientales refleja diferencias estadísticamente significativas entre individuos dentro de los sitios y el alto coeficiente de variación. Lo cual indica que es una variable de poca utilidad para determinar variabilidad genética.

Según el análisis Tukey, los lugares de Kekoldi y La Lupe no difieren estadísticamente; ambos lugares son cubiertos por bosques secundarios densos. Palma Quemada y San Antonio Cabrera son menos cubiertos por el bosque y aunque no difieren de los dos primeros asemejan también a El Salado. El lugar con el ángulo de inserción más bajo fue La Pacífica.

Ancho de la hoja

El ancho de la hoja presentó diferencias estadísticamente significativas dentro de los parches y entre los lugares. Las medias entre los lugares tienen una alta variación ya que hay medidas que variaron desde 17 hasta 24 centímetros

El ancho de la hoja es una característica que no se ve tan afectada por la variación ambiental dentro de los sitios; es decir no hubo relaciones claras entre las características del sitio y el ancho de las hojas. Sin embargo presenta alta variabilidad.

Con respecto a las diferencias entre las poblaciones, el procedimiento Tukey dividió los lugares en dos grupos (A que abarca los lugares Kekoldi, Palma Quemada y La Lupe, y B que incluye los lugares La Pacífica, San Antonio Cabrera y El Salado). Esta característica tiene un coeficiente de variación medianamente alto.

Largo de la hoja

El largo de la hoja presentó una alta significancia dentro de los parches y entre los lugares. Su coeficiente de variación fue bajo (12,3) indicando que esta característica se mantiene relativamente uniforme dentro los lugares. Parece ser una característica poco influenciada por el ambiente, por lo tanto se puede pensar que es de utilidad para determinar la variabilidad genética. Como en las características anteriores se presentan los valores promedios en el Anexo 5.

La prueba de Tukey resultó en la formación de cinco grupos, solo los lugares de Kekoldi y La Lupe., correspondientes a la vertiente del Atlántico fueron estadísticamente similares. El largo de la hoja fue la característica morfológica más útil para distinguir entre las poblaciones.

Cuadro 3. Procedimiento Tukey para hoja.

Lugar	HOJA		
	Ang. inserción	Ancho	Largo
Kekoldi	69,0 A	243,4 A	329,3 A
Palma quemada	63,5 AB	227,3 A	308,4 B
La pacífica	55,9 C	172,8 B	244,0 E
La Lupe	70,4 A	238,6 A	332,5 A
Santa Rosa	64,5 AB	182,9 B	279,4 C
El Salado	60,3 BC	190,3 B	266,2 D

FOLIOLO

Angulo de inserción

Se presentó poca variación entre los lugares muestreados, y dentro de los lugares dentro de un mismo parche. Los lugares que presentan mayor variación son La Pacífica, La Lupe, El Salado y San Antonio Cabrera.

Se observó que donde existía mayor ventilación, el ángulo promedio de inserción era mayor. Existen diferencias significativas entre sitios, lo cual sugiere que hay condiciones ambientales que están incidiendo en el ángulo de inserción, siendo de poca utilidad para la diferenciación de genotipos de la especie.

Según el análisis Tukey, los lugares de San Antonio Cabrera y El Salado, no difieren estadísticamente, se asemejan a La Lupe y difieren totalmente de Kekoldi. El lugar con el ángulo de inserción más bajo fue La Pacífica.

Ancho del folíolo

Se presentaron diferencias estadísticamente significativas dentro de los parches y entre los lugares. Se presentó una alta variación entre las medidas tomadas en los lugares, desde 34 hasta 65 centímetros.

Los lugares donde se observó una mayor variación fueron los de La Pacífica, San Antonio Cabrera y El Salado, sin embargo es una característica que no se vió afectada por la variación ambiental dentro de los sitios; es decir no hubo relaciones claras entre las características del sitio y el ancho de los folíolos, por lo tanto esta característica puede ser usada como una característica para determinar variabilidad genética.

Con respecto al procedimiento Tukey se observa que Palma Quemada y San Antonio Cabrera, están en un mismo grupo, y se asemejan a Kekoldi, y La Lupe. El mayor promedio se presentó en San Antonio Cabrera, lo mismo que el mas bajo. El coeficiente de variación es bajo, lo cual indica que la característica se mantiene uniforme.

Largo del folíolo

El largo del folíolo presentó diferencias estadísticamente significativas dentro de los parches y entre los lugares. Las medias entre los lugares tienen una alta variación, puesto que hay mediciones que fueron tomadas desde 9 hasta 15

centímetros. El coeficiente de variación fue bajo (8,54) lo que indica que esta característica se mantiene relativamente uniforme dentro de los lugares.

El largo del folíolo es una característica que a pesar de que no se pueda comprobar estadísticamente la influencia del ambiente, se observó hay factores como la luminosidad, la humedad, y una menor cobertura del bosque, que están afectando la elongación del folíolo es mayor.

Respecto a las diferencias entre las poblaciones, el procedimiento de Tukey, permite la formación de dos grupos (A correspondiente a los lugares de Kekoldi, Palma Quemada y La Lupe, y B que incluye los lugares La Pacífica, San Antonio Cabrera y El Salado).

Cuadro 4. Procedimiento Tukey para folíolo.

Lugares	Angulo de inserción		FOLIULO			
			Ancho		Largo	
Kekoldi	55,9	A	52,9	A	140,8	A
Palma quemada	53,3	AB	50,4	AB	133,0	A
La pacífica	48,2	C	47,2	C	108,7	B
La Lupe	52,4	ABC	46,6	A	143,9	A
Santa Rosa	50,5	BC	42,9	AB	111,9	B
El salado	51,4	BC	39,8	BC	115,4	B

INFLORESCENCIA

Los siguientes resultados, obtenidos a partir de los datos de inflorescencia e infrutescencia, se basan en observaciones efectuadas solamente en las poblaciones ubicadas en Kekoldi, Palma Quemada y La Lupe (en los demás lugares, no se encontraron ni flores ni frutos).

Largo del pedúnculo

El largo del pedúnculo es una característica que no presenta una alta variación entre o dentro de los lugares. La prueba Tukey permitió agrupar a Kekoldi y

Palma Quemada, en un grupo y a La Lupe, en otro. El mayor promedio se obtuvo de Kekoldi.

Número de pedicelos

El número de pedicelos es una característica en la que hubo una alta variación dentro de parches de los lugares, y entre los lugares, con un coeficiente de variación alto. Los lugares presentan variaciones similares de acuerdo a esta característica.

En Kekoldi se presenta el menor número de pedicelos de todos los lugares estudiados. A pesar de no tener datos y análisis estadísticos, se pudo observar que los parches en los cuales se presenta mayor luminosidad, menor densidad de árboles, y una menor humedad del suelo, es donde se presenta el mayor número de pedicelos.

La prueba Tukey permitió el agrupamiento de los lugares como Kekoldi y La Lupe, en uno solo y de Palma Quemada en otro grupo independiente del anterior. La población de Palma Quemada es en la que se presenta el valor mas alto de las medias en ésta característica.

Número de pedicelos presentes

Los pedicelos presentes presentan alta variación entre lugares. Los lugares que presentan una mayor variación corresponden a Kekoldi, y La Lupe.

Aunque no se puede comprobar estadísticamente, se pudo observar que aparentemente su presencia esta influida por la humedad existente en el suelo, y por la exposición a la luz solar. Además entre mas humedad y mayor iluminación esten presentes, habrá mayor cantidad de pedicelos en la planta.

El procedimiento Tukey permitió el agrupamiento de las poblaciones de Palma Quemada y La Lupe en uno solo y de Kekoldi en otro aparte, de los valores

obtenidos para la prueba, se puede determinar que el menor valor se obtiene en Kekoldi.

Número de pedicelos ausentes

En el número de pedicelos ausentes presentó significancia para parches dentro de los lugares, es la primera característica que presenta esta peculiaridad, en los ejes florales del arbusto. Presenta un coeficiente de variación muy alto (72.04). Es una característica que está variando mucho dentro de los parches, y es importante porque es un indicador de la presencia de flores.

Aunque no se puede comprobar con datos y análisis estadísticos, se observó que donde había mayor luminosidad, humedad, se presentaban menos pedicelos ausentes.

En el procedimiento Tukey, se pudo apreciar que la prueba permitió el agrupamiento de todas las poblaciones en un solo grupo, la media se presentó menor en La Lupe, y la mayor en Kekoldi.

Cuadro 5. Procedimiento Tukey para la inflorescencia.

Lugares	No. Individuos	No. Inflorescencias	INFLORESCENCIA			
			Largo pedúnculo	No. Pedicelos	Pedicelos presentes	Pedicelos ausentes
Kekoldi	8	34	251,3 B	20,4 B	8,6 B	11,8 A
Palma Quemada	10	73	215,3 B	26,0 A	15,4 A	10,6 A
La Lupe	10	40	212,2 A	22,8 B	13,3 A	9,5 A

INFRUTESCENCIA

Número total de ginoforos

En cuanto al número total de ginoforos, encontrados, no presenta diferencias significativas en cuanto a lugar, y parches por lugar. No hay un lugar definido donde se muestre una mayor variación, ya que en todos se muestra mucha similitud.

La prueba de Tukey, permitió agrupar las poblaciones ubicadas en Kekoldi y en Palma Quemada en un mismo grupo, y la población de La Lupe, en otro grupo diferente.

Es una característica que tiene un coeficiente de variación alto (57,89), que indica que no es una característica muy uniforme.

Frutos por ginoforo

No se presentaron estadísticas significativas entre los lugares, ni dentro de ellos; el coeficiente de variación fue bajo (21,1). Aunque sí se pudo observar que la falta de agua puede estar influyendo para que se presente un número mayor de frutos por ginoforo. El lugar en el cual se presentó una mayor variación fue Kekoldi, sin embargo los promedios de todos los lugares fueron poco significativos entre las poblaciones.

Frutos ausentes

Presenta significancia para el análisis entre lugares, pero no entre parches de los lugares; aunque el coeficiente de variación es bastante alto, de un valor alrededor de 60.

A pesar de que no se puede comprobar con datos y análisis estadísticos, se observó que donde había mayor cantidad de frutos, se apreciaba una mayor humedad.

El procedimiento Tukey, permite agrupar a las poblaciones de Kekoldi y Palma Quemada en un grupo diferente del conformado por La Lupe, en la cual se encuentra el valor promedio mas bajo.

Frutos presentes

Se encontró que hubo significancia entre lugares; también se pudo observar que el coeficiente de variación alto (81,8).

Se pudo observar que en los lugares de mayor humedad en el suelo y mayor luminosidad había una mayor cantidad de frutos presentes. En La Lupe es donde se encuentra la menor cantidad de frutos.

El procedimiento Tukey, permitió el agrupamiento de las poblaciones de la siguiente manera, a Kekoldi y a La Lupe las ubicó bajo el mismo grupo, y a la población de Palma Quemada la ubicó en un grupo aparte; en La Lupe fue donde se presentó el promedio menor.

Frutos abortados

En este caso, se presentó una alta variación entre los lugares, pero no dentro de los lugares. El lugar que se presenta una mayor variación fue Kekoldi,. El coeficiente de variación fue de 80,0.

Aunque no se puede comprobar con datos y análisis estadísticos, se observó que donde había mayor ventilación y mayor luminosidad, el promedio de frutos abortados fue mayor.

En cuanto al procedimiento Tukey desarrollado para el análisis de los agrupamientos de las poblaciones de acuerdo a las medias, permitió observar que

hay dos grupos definidos; en uno esta ubicado Kekoldi, con un promedio inferior a todos, y luego están Palma Quemada y La Lupe en otro grupo.

Cuadro 6. Procedimiento Tukey para la infrutescencia

Lugares	No. Individuos	No. Infrutescencias	INFRUTESCENCIA				
			No gino-foros	Fruto/ gino-foros	Frutos ausentes	Frutos presentes	Frutos abor-tados
Kekoldi	7	31	1,9 B	4,3 B	2,5 A	1,7 A	0,2 B
Palma Quemada	7	23	1,8 B	4,6 AB	2,3 A	0,4 B	2,0 A
La Lupe	12	12	3,4 A	4,8 A	0,4 B	2,2 A	2,3 A

4.3.1.2. Variables histológicas

Los estudios histológicos realizados a los tallos de *Quassia amara* nos permitieron observar el mismo patrón celular en todos los muestreos. Las diferencias que se manifiestan en algunos de los parches serán descritas más adelante.

De dichos análisis podemos concluir que los tallos están formados por una peridermis gruesa, donde la región correspondiente al felema se caracteriza por células pequeñas, rectangulares, de hasta 50 capas de grosor. Internamente se aprecia el felógeno y hacia el interior de el, una capa gruesa de esclereidas y fibras. Seguidamente está la región del floema, cuyas células ocupan una área bastante reducida. Es importante destacar que no hubo diferencias entre los muestreos realizados en esta área.

La parte que corresponde al xilema, la cual ocupa la mayor parte del tallo, se caracteriza porque externamente no presenta diferencias entre la región que corresponde a la albura y duramen. La madera presenta una coloración amarillenta, tiene un sabor amargo y al secarse se aprecia la destrucción de la médula, que hace evidente un tallo hueco en el centro. Lógicamente el tamaño del hueco coincide con el que presentaba la médula, siendo este generalmente de tamaño pequeño.

El estudio histológico de la región del xilema permitió observar en todos los muestreos la presencia de vasos grandes, ya sea solitarios o múltiples, en grupos de hasta 13 vasos, condición que varió dependiendo de la ubicación de la población muestreada. Estos vasos aparecen distribuidos uniformemente en todo el xilema y están asociados con parénquima axial de tipo aliforme o bandeado aunque en algunos casos el vaso presenta un parénquima de tipo escaso, en otras ocasiones podemos encontrar mezclas de los diferentes tipos (Figuras 11 y 12).

Por otro lado en algunas de las muestras analizadas se observó claramente la formación de anillos de crecimiento, los cuales no estuvieron tan claramente definidos en otras de las muestras. Podemos decir entonces que esta fue una de las principales diferencias que se manifestaron en las muestras estudiadas. Así mismo se observó un precipitado granuloso taponeando los vasos. En algunas de las muestras dicho taponamiento fue mas frecuente en aquellos vasos que estaban ubicados cercanos a la región medular, mientras que en otros se encontraron distribuidos en todo el tejido (Figuras 13 y 14).

4.3.2. Diferenciación de las poblaciones

4.3.2.1. Variables morfológicas

Para el análisis de los seis lugares, la prueba utilizada de Lambda de Wilks es altamente significativa, como puede observarse en el cuadro 7.

Cuadro 7. Significancia del estadístico Lambda de Wilks

Estadístico	Valor	F	Pr > F
Wilks'			
Lambda	0.02800956	4.9903	0.0001

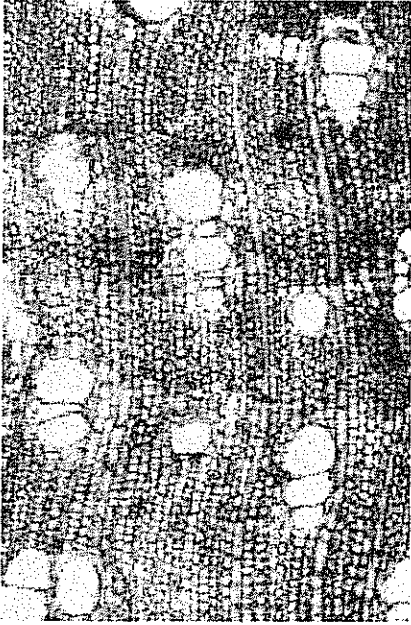


Figura 11. Sección transversal donde se muestra el parénquima axial bandeado

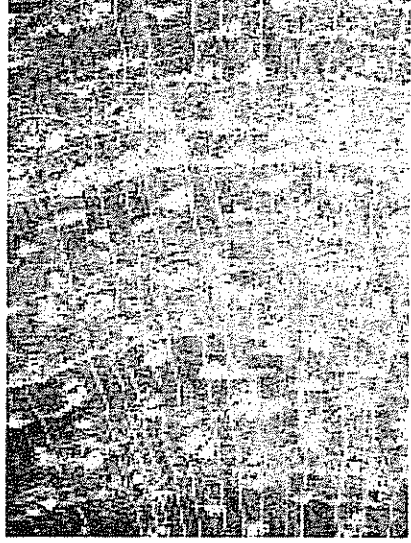


Figura 12. Sección transversal donde se muestra el parénquima axial uniforme

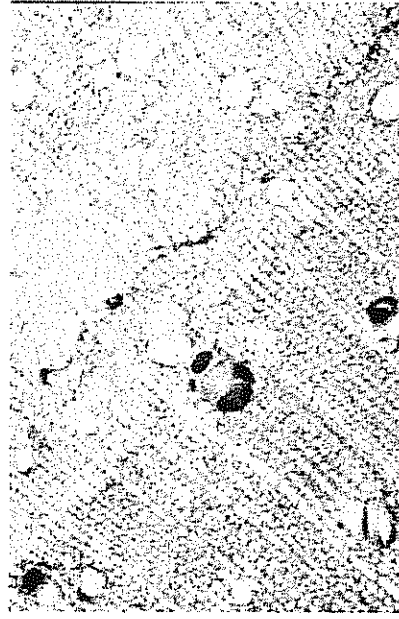


Figura 13. Taponamientos de los vasos

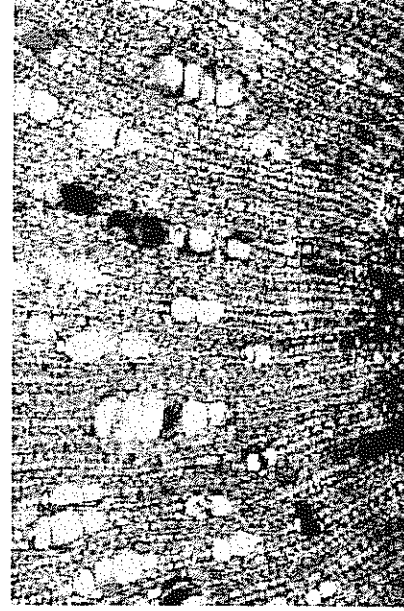


Figura 14. Rayos uniseriados

La variabilidad que explica el canónico 1, es de 55%, la variabilidad que explica el canónico 2, llega a un 19%, y la que explica el canónico 3 corresponde a un 16%. En total la variabilidad que explican los tres canónicos, alcanza a un 91% de la variabilidad total, además los tres son altamente significativos (Cuadro 8).

Cuadro 8. Variación aportada por cada canónico.

Canónico	Valor propio	Diferencia	Proporción	Proporción acumulada	Pr > F
1	3.6339	2.3615	0.5558	0.5558	0.0001
2	1.2724	0.2265	0.1946	0.7504	0.0001
3	1.0459	0.6332	0.1600	0.9104	0.0001
4	0.4127	0.2396	0.0631	0.9735	0.0269
5	0.1731		0.0265	1.0000	0.2731

En el canónico 1, las variables que más explican de la variabilidad son el ancho de la hoja, el largo de la hoja y el largo del folíolo. En el canónico 2 la variable altura, es la de mayor contribución y en el canónico tres a pesar de ser una variable significativa, sus componentes, tienen pesos bajos que expliquen su conformación. Lo anterior puede observarse en el cuadro 9.

Cuadro 9. Estructura del canónico.

	CAN1	CAN2	CAN3	CAN4	CAN5
ANGIHOJ	0.475237	-0.085541	0.210165	-0.391139	0.135107
LARGOFOL	0.800334	-0.139527	0.050224	0.070614	-0.338992
ANCHOFOL	0.523398	-0.233709	0.370142	-0.086689	-0.118722
ANGIPEC	0.470583	-0.163702	0.256101	0.124294	-0.175470
LARGOHOJ	0.812728	-0.210045	0.208094	0.086669	-0.159978
ANCHOHOJ	0.839330	-0.169043	0.066513	-0.068643	-0.140371
COLORHA	-0.148666	-0.119919	0.014462	0.349808	0.112322
COLOREN	-0.199556	0.382375	0.390579	0.061901	0.062555
TEXTFOL	0.171672	0.275423	-0.446730	0.280608	0.509921
DIAM	0.395931	-0.320636	0.388381	0.521490	0.092177
ALT	0.477212	0.829948	0.020111	-0.020162	-0.071055

FCOPA	-0.526745	0.205172	0.180288	0.442151	-0.151782
-------	-----------	----------	----------	----------	-----------

En la figura 15, se puede observar que en el canónico 1 que tiene que ver con el largo, ancho de la hoja, y largo del foliolo, agrupa las poblaciones ubicadas en Kekoldi, Palma Quemada y La Lupe, de un lado, siendo similares entre si, y también se puede observar que las poblaciones de La Pacífica, El Salado y San Antonio Cabrera poseen valores similares, pertenecen a un grupo que puede diferenciar del anterior formado por esas poblaciones. Se puede también observar que la altura del arbusto según el discriminante canónico 2, permite mezclarse las poblaciones de, Palma Quemada y La Lupe, San Antonio Cabrera, permite también diferenciar bastante a la población de El Salado, ya que esta posee las mayores alturas.

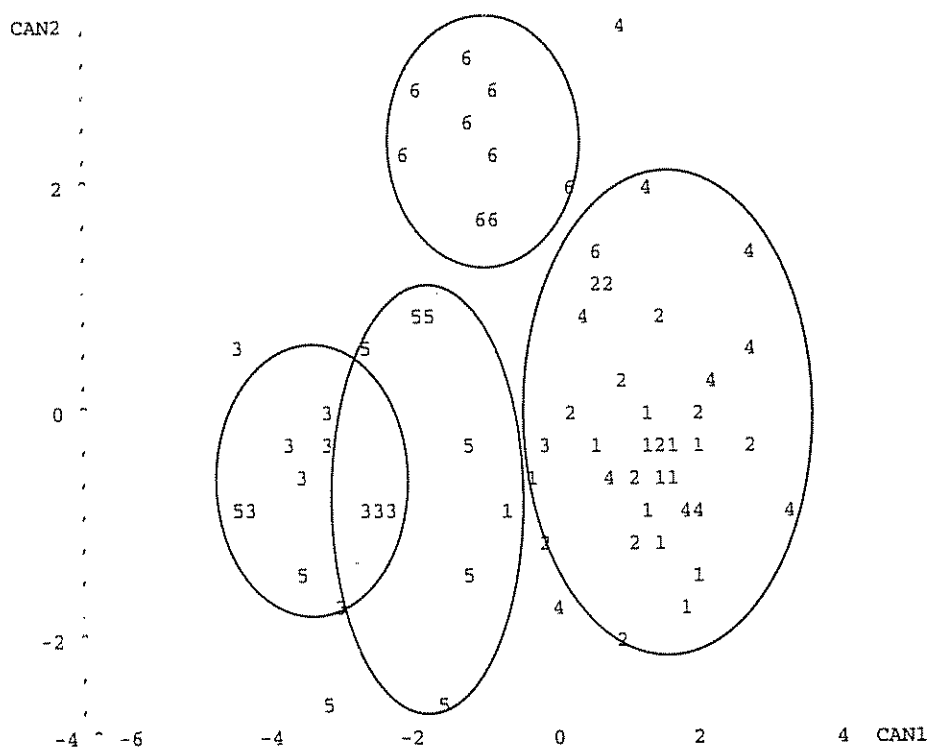


Figura 15. Discriminante canónico C1, C2 (1=Kekoldi, 2=Palma Quemada, 3=La Pacífica, 4= La Lupe, 5=San Antonio Cabrera, 6=El Salado).

4.3.2.2. Variables histológicas

Se observó un mayor taponamiento en los parches de las regiones de Palma Quemada y La Pacífica en comparación con el resto de los lugares muestreados, no obstante este comportamiento no fue uniforme en todos los parches que conformaron cada una de estas regiones, por lo tanto es una característica que presenta variación, que está siendo poco influenciada por el medio ambiente. Por otro lado, la región con menos taponamientos de vasos fue la de Kekoldi.

En lo que respecta a parénquima radial todos los muestreados, permitieron establecer que los rayos parénquimáticos son uni y biseriados (Figura 16).

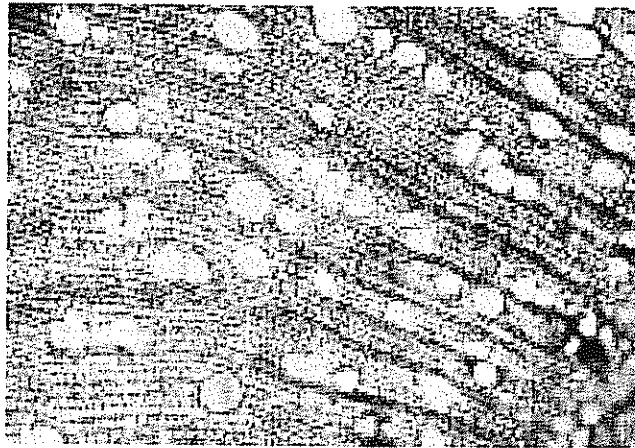


Figura 1. Rayos parenquimáticos

A continuación se presentan las características estudiadas que permitieron determinar si había diferencia entre los arbustos dentro de los parches y entre lugares.

Se obtuvieron los datos de las características por parche en cada lugar.

Cuadro 10. Principales características histológicas de la madera.

LUGAR DE MUESTREO	Parche	Anillos de crecimiento	Tipo de parénquima axial	Agrupamiento de vasos	Promedio de vasos/parche*
Kekoldí	Parche 1	Poco evidentes	Aliforme Bandeado	1-4	25.5
	Parche 2	Poco evidentes	Aliforme Bandeado	1-6	30.5
	Parche 3	Poco evidentes	Aliforme Bandeado	1-3	33.8
Palma Quemada	Parche 1	Poco evidentes	Bandeado	1-6	32.8
	Parche 2	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-5	34.7
	Parche 3	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-5	40.5
	Parche 4	Poco evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-5	28.4
La Pacífica	Parche 1	Muy evidentes	Aliforme Bandeado	1-3	22.7
	Parche 2	Muy evidentes	escasos	1-5	34.8
	Parche 3	Poco evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-6	29.3
	Parche 4	Poco evidente	Bandeado	1-6	17.8
La Lupe	Parche 1	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-6	26.4
	Parche 2	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-5	24.8
	Parche 3	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-6	28.6
	Parche 4	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-6	28.8

*) Promedio de 10 campos ópticos bajo un objetivo de 25 X

...Continuación Cuadro 10.

LUGAR DE MUESTREO	Parche	Anillos de crecimiento	Tipo de parénquima axial	Agrupamiento de vasos	Promedio de vasos/ parche*
San Antonio Cabrera	Parche 1	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-13	35.8
	Parche 2	Poco evidentes	Aliforme Bandeado	1-11	27.9
	Parche 3	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-6	31.3
	Parche 4	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado,	1-6	21.1
El Salado	Parche 1	Muy evidentes	Aliforme-Bandeado, escasos	1-5	44.9
	Parche 2	Muy evidentes	Aliforme y Bandeado, escasos	1-4	27.5
	Parche 3	Muy evidentes	Aliforme Bandeado	1-6	33.8
	Parche 4	Muy evidentes	Bandeado	1-8	31.6

Los resultados anteriores nos permiten observar muy pocas diferencias entre los muestreos, y aunque se aprecian diferencias numéricas entre los promedios del número de vasos en cada parche, los análisis estadísticos no reflejan diferencias significativas lo cual se puede apreciar en el Anexo 6.

4.4. CONCLUSIONES

4.4.1. Comportamiento de las variables

La dificultad de obtener las inflorescencias e infrutescencias hace difícil la realización de la caracterización basados en estas características.

En ocasiones las medidas de los promedios tomados mostraron variación, debido a que se encontraban plantas con unas inflorescencias de diferente tamaño, en la misma planta.

En cuanto a la infrutescencia, se pudo observar que se presentan diferencias pero entre frutos de las regiones, pero que no fue un factor que estadísticamente pudiera aportar al conocimiento de la variabilidad de la especie, quizá debido a la falta de información básica para esta característica.

Los frutos abortados es una buena característica para observar en el momento de la floración, ya que se puede determinar el potencial de fructificación de la especie de acuerdo a la población, y analizar mas a fondo si están influenciando factores ambientales, de una manera determinante en este proceso o si se debe a alguna influencia genética.

Es importante analizar la manera como se distribuyen las variables, en gráficos que tengan datos de promedio y varianza, para analizar si son de tipo continuo o discontinuo, puesto que en el mejoramiento forestal las especies que mas interesan son las que están regidas por varios genes, o sea, características de tipo continuo o que posean promedios que permitan tratarlas como variables de tipo continuo. Por ejemplo, variables de crecimiento, forma del fuste, ángulo de las ramas, etc (Cornelius 1994), ya en condiciones de un ambiente homogéneo para

las poblaciones muestreadas, con el propósito de llegar a un conocimiento mas real del tipo de variable.

4.4.2. Diferenciación de las poblaciones

El uso de los discriminantes canónicos contribuyen a explicar las diferencias entre las poblaciones o grupos de plantas, y permiten observar cual de las características es la que más contribuye en porcentaje a esa diferenciación de las especies.

En general se puede llegar a la conclusión que el largo del folíolo, largo de la hoja y ancho de la hoja, son características que permiten diferenciar las poblaciones de Kekoldi, La Lupe, y Palma Quemada, con valores similares, de las poblaciones de La Pacífica, San Antonio Cabrera y El Salado.

La altura del arbusto permite distinguir a la población de El Salado en un grupo diferente, y a las poblaciones de Palma Quemada, La Lupe, San Antonio Cabrera, entremezclarse, debido a valores similares de esa variable.

4.4.3. Características cuantitativas y cualitativas

4.4.3.1. Características cuantitativas

Es importante tener en cuenta que las características cuantitativas son las que están influenciadas por un mayor número de genes.

El largo y el ancho de la hoja y del folíolo son características que están poco influidas por el medio ambiente, tienen coeficientes de variación bajos, poseen variaciones altas dentro de los lugares y entre ellos, además tienen importancia también por su valor discriminante al dividir a las poblaciones en grupos definidos.

La altura del arbusto es una característica que es importante tenerla en cuenta para el análisis, ya que ayuda a la conformación de grupos a partir de las poblaciones, además de que es importante como característica de tipo continuo.

La variable diámetro del arbusto tiene también valor como variable que ayuda a la discriminación de grupos, por lo tanto es importante incluirla en análisis posteriores de *Quassia amara*.

El largo del pedúnculo, es una característica que aunque en el presente estudio no se pudo obtener una muestra homogénea, debido a la falta de estructuras reproductivas en algunas poblaciones, si esta indicando que tiene gran variación dentro de la planta, y un coeficiente de variación un poco alto

4.4.3.2. Características cualitativas

Algunas de las características a las que se tomarón datos en el bosque, pero que no se apreciaron diferencias observables en el bosque, ni dentro de los parches, ni entre los lugares, estas características fueron pubescencia del haz, forma del foliolo, forma de la corteza, y color de la flor.

Las características como el color del envés, y textura del foliolo son interezantes para tenerlas en cuenta en estudios posteriores, debido al aporte en la variación de la planta para llegar a la conformación de grupos.

Dentro de las características cualitativas que están siendo poco influenciadas por el ambiente, se encuentran la ausencia de frutos, y el taponamiento de los vasos en el caso de la estructura interna de los tejidos, sin embargo el número de ginoforos y la ausencia de frutos tienen coeficientes de variación de mas de 50.

4.4.4. Toma de datos

Es importante tener en cuenta la época de floración y fructificación para caracterizar las poblaciones con base en sus estructuras reproductivas.

Es importante reconocer que algunos descriptores pueden estar siendo influenciados por diferentes factores como la edad, la posición dentro del árbol, y los factores climáticos, que pudieron haber indicado variación aparentemente de tipo genético.

Fue interesante estimar la variabilidad fenotípica de la especie en los bosques porque esto es un primer paso dentro del conocimiento de las especies que pueden tener un interés especial para las comunidades que utilizan los recursos genéticos con diferentes fines. Por tanto se recomienda realizar una posterior caracterización molecular que lleve a un mayor conocimiento de la especie, corroborando la información obtenida con el presente trabajo, y ayude en un futuro como soporte a la investigación de nuestros recursos.

5. PARTE II: METODOLOGIA DE EXTRACCION DE ADN

5.1. RESEÑA BIBLIOGRAFICA

El aislamiento de ADN celular, es de gran importancia celular ya que representa una etapa preliminar definida para todos los estudios de biología molecular (Nuñez *et al.* 1993). El ADN es un material privilegiado para el estudio de las relaciones filogenéticas a causa de la frecuencia muy baja de los cambios estructurales y de la presencia de secuencias conservadas (que han tenido una evolución lenta). Las técnicas de aislamiento de ADN se fundamentan en la susceptibilidad diferencial de los ácidos nucleicos a los efectos desnaturalizadores de los disolventes orgánicos (Anthony 1995).

De la adecuada extracción de ADN, depende los resultados futuros de la investigación. Algunos de los factores que inciden son: especie de planta, tipo de material como hojas, raíces y tallos, textura, estado de la muestra (fresca, congelada, seca o liofilizada). La calidad de ADN requerido depende de su uso. Si es PCR se requiere de pequeñas cantidades, calidad media; en cambio, los RFLP, requieren de grandes cantidades con una alta calidad del material extraído. Depende de la fuente, ya sea núcleo, mitocondria, cloroplasto, y de la cuantificación para la determinación de la concentración de ADN la cual se puede realizar mediante gel de agarosa, espectofotómetro, fluorómetro (Philips 1997).

5.2. MATERIALES Y METODOS

5.2.1. Localización

Los estudios de extracción se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la unidad de Biotecnología ubicado en el CATIE situado en Turrialba durante los meses de Febrero, Marzo y Abril de 1998.

5.2.2. Método de extracción

Se evaluaron tres métodos de extracción de ADN denominados:

1. CTAB-minipreparaciones descrito por Harris (1996)
2. Del xanthogenato descrito por Jhingan (1992)
3. Cacao, originalmente definido por Tanksley para ser usado en el laboratorio del CATIE para la extracción de ADN de cacao.

En el Anexo 7A se anotan en forma detallada las metodologías.

5.2.3. Material evaluado

Origen

El ADN se extrajo de hojas obtenidas a partir de arbustos ubicados en la comunidad indígena de Kekoldi, Talamanca, provincia de Limón, Costa Rica. El sitio de muestreo se categoriza como bosque tropical húmedo caliente, con temperatura promedio anual de 26°C y una precipitación media anual entre 2000 y 3000 mm (Ling 1995), Kekoldi es una comunidad ubicada en los alrededores del río Carbón, a unos 9°38' de latitud norte y 82°46' longitud oeste, en un área accidentada y con fuertes pendientes en la continuación de la fila Carbón (Ocampo, et-al 1997). Dichos arbustos crecen en forma silvestre en el borde de un bosque agrupados en pequeños parches. Se recolectaron muestras de hojas pertenecientes a diferentes árboles distanciados 300 metros entre ellos. Los arbustos de los cuales se recolectaron hojas se denominaron árbol 1,2,3,4,5, y 6.

Edad

Se evaluaron tres estados de desarrollo de las hojas: De acuerdo a la apariencia que presentan las hojas.

- a) Hoja joven: Es considerada como la hoja que aún presenta pigmentación rojiza, y en la que los folíolos terminales aún se muestran inmaduros es decir, enrollados sobre su propio eje.
- b) Hoja intermedia: Se considera la hoja que ya no presenta pigmentación rojiza, pero que aún le falta por desarrollar sus folíolos, hasta alcanzar el estado de madurez, su coloración es un verde claro, y toda la hoja es en general mas suave, que cuando llega al estado de madurez.
- c) Hoja adulta: Considerada como la hoja que está en estado de madurez, es la que no presenta ni coloración rojiza o verde claro, en la que las hojas están firmemente adheridas al raquis, y en la cual la venación se puede observar completamente desarrollada.

Estado del material

Se analizó tres tipos de material:

- a) Muestras frescas: hojas que fueron procesadas aproximadamente 24 horas después de cosechadas. Para proteger el material, luego de su cosecha, las hojas fueron envueltas en papel toalla humedecido con agua limpia y finalmente transportadas a Turrialba.
- b) Muestras congeladas: se colocaron muestras frescas obtenidas según se describe en el punto anterior, en el congelador a -20°C al menos dos días. Para el análisis de estas muestras, las hojas una vez sacadas del congelador fueron inmediatamente procesadas.
- c) Muestras secas: desde su recolección en el campo, las hojas fueron colocadas en bolsas plásticas con sílica gel hasta que se secaran totalmente, lo cual duró aproximadamente 6 días.

5.2.4. Experimentos realizados

Se llevaron a cabo varios experimentos en los que se evaluaron los tres métodos de extracción indicados anteriormente, combinando diferentes edades (jóven, intermedia y adulta) y estados de muestra (frescas, secas y congeladas). En cada caso se siguió el protocolo establecido por el autor original, salvo pequeños cambios que buscaron adaptarlo a las condiciones del laboratorio y a las características de la muestra procesada.

Estos cambios ya están incluidos en los procedimientos del Anexo 7. Dado que se seleccionó el método CTAB-minipreparaciones como el mejor, la mayoría de las evaluaciones se hicieron siguiendo este procedimiento.

Con el objeto de mejorar los rendimientos de ADN obtenidos con este método al usar muestras secas, se evaluó el efecto de tres diferentes tamaños de muestra (0,05; 0,1 y 0,2 g) y tres diferentes pH del buffer de extracción (7.5, 8.0 y 8.5), el cual normalmente se usa a un pH de 8.0. El pH fue regulado con NaOH concentrado 1N, HCl 0.1 a 1.0 N.

5.2.5. Metodología de análisis de los experimentos

5.2.5.1. Factorial

Con el propósito de determinar el efecto del estado de madurez de la hoja y del tipo de material en la concentración de ADN que se puede extraer de la hoja de *Quassia amara*, se realizaron dos análisis factoriales. El factor estado de madurez tuvo tres niveles (joven, intermedio y adulto) y el factor tipo de material dos (fresco y congelado).

5.2.5.2. Procedimiento w de Tukey

Se realizó este procedimiento para determinar la igualdad de las medias entre los tratamientos.

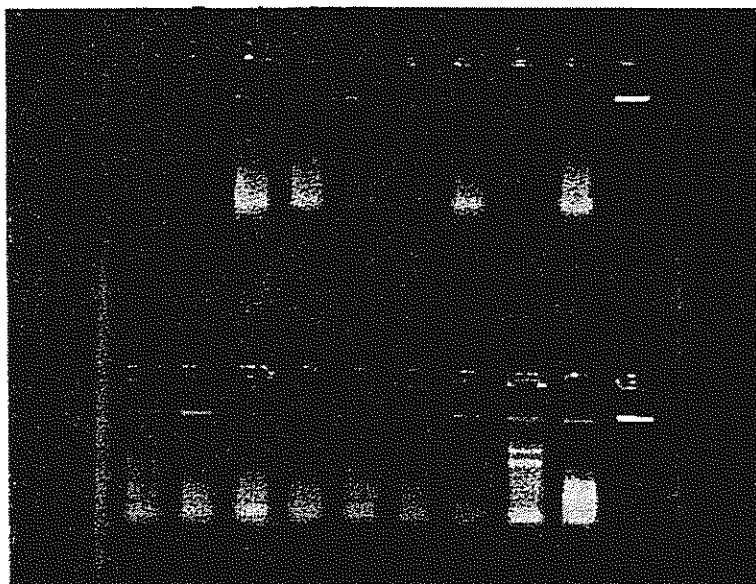
5.3. RESULTADOS Y DISCUSION

Se seleccionó el método CTAB-minipreparaciones como el más eficiente para la extracción de ADN, pues produjo entre 30 y 150 ng de ADN/ μ l, partiendo de muestras frescas o congeladas de 0,2 g de hoja. Aunque con los métodos Xantogenato y de cacao fue posible obtener ADN, los resultados fueron erráticos y en la mayoría de los casos, las concentraciones de ADN fueron bajas o nulas. Para el método del Xantogenato se obtuvo un máximo de 53 ng/ml usando hoja joven congelada y para el método Cacao la concentración no superó los 20 ng/ml.

Al evaluar mediante análisis de varianza tres diferentes edades de hoja y dos estados de muestra provenientes de tres árboles de *Quassia amara*, no se encontró diferencias significativas entre los estados de muestras analizados (fresco y congelado), pero sí, entre las tres edades analizadas (joven, intermedia y adulta).

Puede observarse que hubo diferencias significativas debidas a la repetición, lo cual fue confirmado en otros experimentos. En términos prácticos, esto implica que en todos los casos se debe recolectar una cantidad suficiente de hojas por cada árbol, para asegurar la cantidad de ADN que se vaya a usar. En el cuadro 11 se observa también, que es más eficiente la extracción de ADN de hojas jóvenes que de hojas intermedias o adultas. Esta situación puede observarse en la figura 17.

IS AS JC JS IS AS JC AC JS M79



AC JC IC AC JS AS JC JS IS M79

Figura 17. Comparación de diferentes estados de hoja y de muestra. Hoja joven y adulta (A=adulta, J=joven, I=intermedia, C=congelada, S=sílica)

Esto se explica por la mayor facilidad que tiene el tejido joven de ser procesado, y porque el contenido de ADN de las células es similar a pesar de que éstas tengan un mayor tamaño, como es el caso de las hojas adultas.

Cuadro 11. Evaluación de tres edades de hoja y dos estados de muestra de un genotipo de *Quassia amara* para la extracción de ADN.

Edad y Estado de la hoja	Repetición 1	Repetición 2	Repetición 3
Adulta fresca	100	40	120
Adulta congelada	80	30	80
Intermedia fresca	30	30	50
Intermedia congelada	40	.	150
Joven fresca	.	120	150
Joven congelada	100	120	150

La relación existente entre la edad y el contenido de ADN, se puede apreciar en el siguiente ANAVA, en el cual se muestra la significancia cuando se analiza la edad

como determinante de la concentración de ADN, . Igualmente no se encontró mayor diferencia en el rendimiento de ADN obtenido con hojas frescas o con hojas congeladas. Esto implica que es factible congelarlas, cuando es imposible llegar rápido al laboratorio para procesar las muestras. Lo mismo aplica para muestras que una vez cosechadas, no se pueden o no se quieren procesar inmediatamente, sino más bien, conservar por algunos meses. El periodo de conservación deberá ser calculado experimentalmente, pues depende probablemente de varios factores, entre ellos, el nivel de deterioro de la hoja, su edad, procedencia, contenido de humedad, etc.

Cuadro 12. ANAVA de la concentración de ADN, en varios genotipos.

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
Edad	2	5747.9	4.37	0.0434 *
Estado	1	233.3	0.18	0.6827NS
Edad*Estado	2	2475.1	1.88	0.2027NS
Error	10	1316.6		
Total	15			

$\alpha = 0.05$, *significativo NS= no significativo C.V. 41.7

Mediante el procedimiento de Tukey, se puede determinar que las medias de las concentraciones encontradas en los estados congelado y fresco, permiten agrupar a los tratamientos bajo un mismo grupo. En el cuadro 13 se presentan los resultados de una evaluación similar a la descrita anteriormente pero con la variante de que en vez de tres árboles, se usó sólo uno submuestreado dos veces.

Cuadro 13. Evaluación de tres edades de hoja y dos estados de muestra de *Quassia amara* para la extracción de ADN.

Estado	Fresco Repetición 1 – 2	Congelado Repetición 1 – 2
Adulto	40 – 50	40 – 80
Intermedio	50 - 50	35 – 50
Congelado	30 - 80	40 - 90

Nuevamente se encontró que no hay diferencia en la cantidad de ADN extraído a partir de hojas frescas en relación con hojas congeladas. También las hojas jóvenes produjeron la mayor cantidad de ADN, seguidas por las hojas adultas y finalmente por las intermedias. Esto es mostrado en el siguiente análisis de varianza, con el cual se puede apreciar que no hay significancia teniendo en cuenta las edades de los arbustos a los cuales se les extrajo la muestra así como también el estado de la muestra, como aparece en el cuadro 14.

Cuadro 14. ANAVA de la concentración de ADN, en un solo genotipo.

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
Edad	2	189.5	0.33	0.7322NS
Estado	1	102.1	0.18	0.6887NS
Edad*Estado	2	139.5	0.24	0.7925NS
Error	6	577.1		
Total	11			

$\alpha = 0.05$, NS= no significativo C.V. 45.39

De acuerdo a las pruebas realizadas mediante el procedimiento de Tukey, para el análisis de medias, demostró que las medias son similares en cuanto a la concentración presentada de acuerdo a la edad, por el agrupamiento que realiza ubicándolas en el mismo grupo.

La misma situación se presenta cuando se observa el agrupamiento que se realiza teniendo en cuenta los estados de la hoja, al determinar la prueba que realmente las medias están dentro del mismo grupo.

Cuando no se cuente con sistemas de congelación para conservar las muestras, el mejor método para mantener y transportar las hojas de sitios aislados o distantes hacia el laboratorio, sería secándolas con sílica gel. Por esta razón se llevaron a cabo varias pruebas con el método CTAB, tendientes a maximizar los rendimientos de ADN. Ya que es posible que solo se encuentren hojas adultas al momento de realizar colectas *in situ* de *Quassia amara*, los experimentos en esta etapa se concentraron en este tipo de hojas, lo cual según los resultados anteriores representaría la situación más extrema.

Al evaluar tres tamaños de muestra seca (0,05; 0,1 y 0,2 g), se determinó que el mejor tamaño para trabajar con material seco era 0,1 g, porque con 0,05 g se minimizaban los rendimientos de ADN y con 0,2 g se producían problemas de tipo mecánico, al volverse muy difícil su manipulación en los tubos Eppendorf. Con relación a los tres diferentes pH del buffer de extracción evaluados, se encontró que estos valores no tenían mayor influencia sobre el rendimiento de ADN.

Se encontró que a pesar de ser factible extraer ADN de muestras secas con la metodología propuesta, esto no es posible en todos los casos. Cuando es posible, los rendimientos de ADN se reducen significativamente en comparación a los obtenidos con muestras frescas o congeladas. El método del Xantogenato y el de Cacao no produjeron resultados alentadores. Lo anterior hace necesario seguir trabajando en la obtención de un método más eficiente de extracción en hojas secas, a ser usado cuando sea imposible trabajar con material fresco o congelado. Mientras tanto, en los casos en que sea posible y en los que definitivamente se pueda contar con material fresco o congelado, se podría realizar diferentes extracciones de material de interés hasta completar la cantidad deseada de ADN.

5.4. CONCLUSIONES

Se concluye que la mejor muestra para extraer ADN en *Quassia amara* son hojas jóvenes frescas o congeladas. Las mismas deben ser procesadas usando el

método CTAB-minipreparaciones, partiendo de una cantidad inicial de 0,2 g. Es factible extraer ADN con ese mismo método a partir de hojas de edad intermedia o adulta pero los rendimientos de ADN son menores.

La extracción de ADN usando el método CTAB-minipreparaciones a partir de 0, 1 g de hojas secas es factible, pero se obtienen cantidades significativamente inferiores con relación las obtenidas con muestras frescas o congeladas y en algunos casos no es posible obtener ADN.

La determinación de un método de extracción de ADN, es fundamental como un primer paso en la aplicación de otras herramientas moleculares, dentro de las cuales, la de uso inmediato será para marcadores moleculares.

6. RECOMENDACIONES

El presente estudio fue de gran importancia ya que permitió el conocimiento de la especie en su ambiente natural, el conocimiento del valor dado por las comunidades, el reconocimiento de las diferentes poblaciones en los países de Centro América, y la recolección de muestras que servirán para los diferentes análisis, esto hace que realmente la caracterización de germoplasma sea un paso de gran importancia en el reconocimiento del valor de las especies y de su posible manejo a partir de las observaciones realizadas en el campo.

Se debe tener en cuenta que *Quassia amara*, es una especie de gran valor para las comunidades visitadas de Centro América, ya que en este arbusto encuentran la medicina y la manera de controlar insectos, por lo tanto es importante hacer un manejo de ella en el bosque tanto in situ como ex situ para manejarla y conseguir no solo conservarla sino también aprovecharla de una manera sostenible. Se debe tener en cuenta que la pérdida de casi 400 mil ha de bosque productivo natural se debe primordialmente a la agricultura migratoria, a la agricultura y ganadería permanentes, a la urbanización y no a la industria forestal (Flores 1987), y recientemente con lo acontecido en los bosques de Centro América debido al huracán Mitch, se hace necesario aún más la protección de los recursos fitogenéticos que tengan gran valor y un gran potencial.

Es importante realizar pruebas de progenie que permitan analizar correlaciones entre las características fenotípicas, con las características que han sido de interés para las comunidades y entidades interesadas en este recurso, como son el principio amargo y los contenidos de cuasinoides presentes en la planta, características de gran importancia en esta *Quassia amara*. También, para determinar que diferencias observables entre las descendencias pueden ser debidas a un componente genético, que debidas a factores externos.

Es necesario para un estudio de histología en el que haya un reconocimiento de la evolución de la especie, que se realice la medición de la longitud y del ancho de los vasos ya que los caracteres de los elementos de vasos son usados muy a menudo como indicadores del avance filogenético. Estos estudios deben darse sobre una base estadística, para encontrar relaciones entre los caracteres analizados, es así como se ha encontrado que una relación de la longitud del elemento del vaso y el ancho tangencial produce un dato útil de aplicación en los índices de avance. Aunque se debe asegurar que las comparaciones sean hechas entre plantas que crecen en condiciones similares, puesto que el habitat puede influir el diámetro del vaso (Cutler 1978).

Se debe calcular la cantidad mínima de muestra para hacer posibles estudios de correlaciones entre la parte química y morfológica, al igual que es importante tener en cuenta la muestra mínima para los estudios de estructura interna ya que en muchas ocasiones se encontraron diferencias entre las poblaciones, pero que no fueron significativas debidas a la cantidad de muestra.

7. LITERATURA CITADA

- Anthony, F. 1995. Curso de Mejoramiento genético II, Turrialba, Costa Rica, CATIE 11p.
- Barbetti, P.; Grandolini, G.; Fardella, G., Chiappini, I. 1993. Quassinoids from *Quassia amara*. *Phytochemistry*, 32(4): 1007-1013.
- Boson, R. 1978. Desarrollo integral de los recursos forestales. Costa Rica. Los bosques del país y su distribución por provincias. San José, Costa Rica, Dirección General Forestal/GTZ. 63p.
- Brown, N. 1995. The autoecology and agroforestry potential of the bitterwood tree *Quassia amara* L. ex Blom (Simaroubaceae). Ph D., Thesis. Cornell, Cornell University. 250p.
- Busbey, R. 1939. A bibliography of quassia. United States Department of Agriculture, Bureau of Entomology and Plant Quarantine, 56 p.
- Caséres, A., Jáuregui, E.; Villalobos, R. 1995. Efecto de las condiciones ambientales en la actividad antimicrobiana de *Quassia amara*. In: Ocampo, R., ed. Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Actas, Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 97-99.
- Clement, C. 1986. *Bactris gasipaes*. Lista mínima de descriptores para el banco de germoplasma. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 15p.
- Clement, C. 1986. Descriptores mínimos para el pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) y sus implicaciones filogenéticas. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 128 p.
- Contreras, A.M. 1992. Recursos fitogenéticos y su uso en agricultura marginal. In Taller Internacional sobre el Agroecosistema Andino (1992, Lima, Perú). Anales. Lima, CIP. p. 259-270.
- Cornelius, J. 1994. La variación genética. In: Cornelius, J.; Mesén, J.; Corea, E. eds. Mejoramiento genético forestal. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 218p.
- Crisci, J.; López, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Washington, D. C., OEA. 132p
- Croat, T.B. 1978. Flora of Barro Colorado Island., Stanford, California, Stanford University Press.

- Cronquist, A. 1944. Studies in the Simaroubaceae; 4 resume of the American genera Brittonia 5: 128-147.
- Cutler, D.F. 1978. Applied plant anatomy. London. Logman Group Limited. 193 p.
- Esquinas, J.T. 1990. La agricultura y los recursos genéticos. Seforven. 1(2): 28-29.
- Fahn, A. 1974. Anatomía vegetal. Madrid H. Blume Ediciones. 643p.
- FAO. 1998. Plan de acción forestal en los tropicos, América Latina y el Caribe. Roma, Italia. p. 73-86.
- Flores, E. 1994. La planta: estructura y función. 2^a ed. Cartago. Editorial Tecnológica de Costa Rica. 504 p.
- Flores, J. 1987. Desarrollo industrial basado en el sector forestal. In Plan de acción forestal tropical subregión Centroamérica y Panamá. Turrialba, Costa Rica, CATIE. p. 34-35.
- Hamer. R. 1996. Multivariate statistical methods: practical applications course notes. SAS Institute Inc. 639 p.
- Hohn, H.; Hopli, H.; Graf, B. 1996. Quassia und Neem: exotische insektizide im Obstbau. Obst-Weinbau. 132(3): 62-63.
- Holdridge, L. 1987. Ecología basada en zonas de vida. San José, Costa Rica, IICA. 216 p.
- IPGRI. 1996 Introduction to collecting -2-Unit 8.1.1. Versión 1.3. p. 2-25.
- IBPGR. 1985. Descriptors for *Vigna aconitifolia* and *V. trilobata*. IBPGR secretariat Rome, Italia, IBPGR. p.39.
- Leigue, L. 1997. Elementos ecológicos para la silvicultura de *Quassia amara* en Talamanca, Costa Rica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 83p.
- Ling, F. 1995. Estudio ecológico de *Quassia amara* en la Reserva Indígena de Kekoldi, Costa Rica. In: Ocampo, R., ed. Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Actas. CATIE. Costa Rica. Serie Técnica. Informe Técnico no. 267. p. 56-67.
- López, G.; López, J. 1995. Introducción al micro SAS: Aplicación al análisis de experimentos agrícolas. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 119p.
- García, H. 1992. Flora medicinal de Colombia. (Botánica Media II) 2. ed. Bogotá, Colombia, Tercer Mundo. p. 44-47.

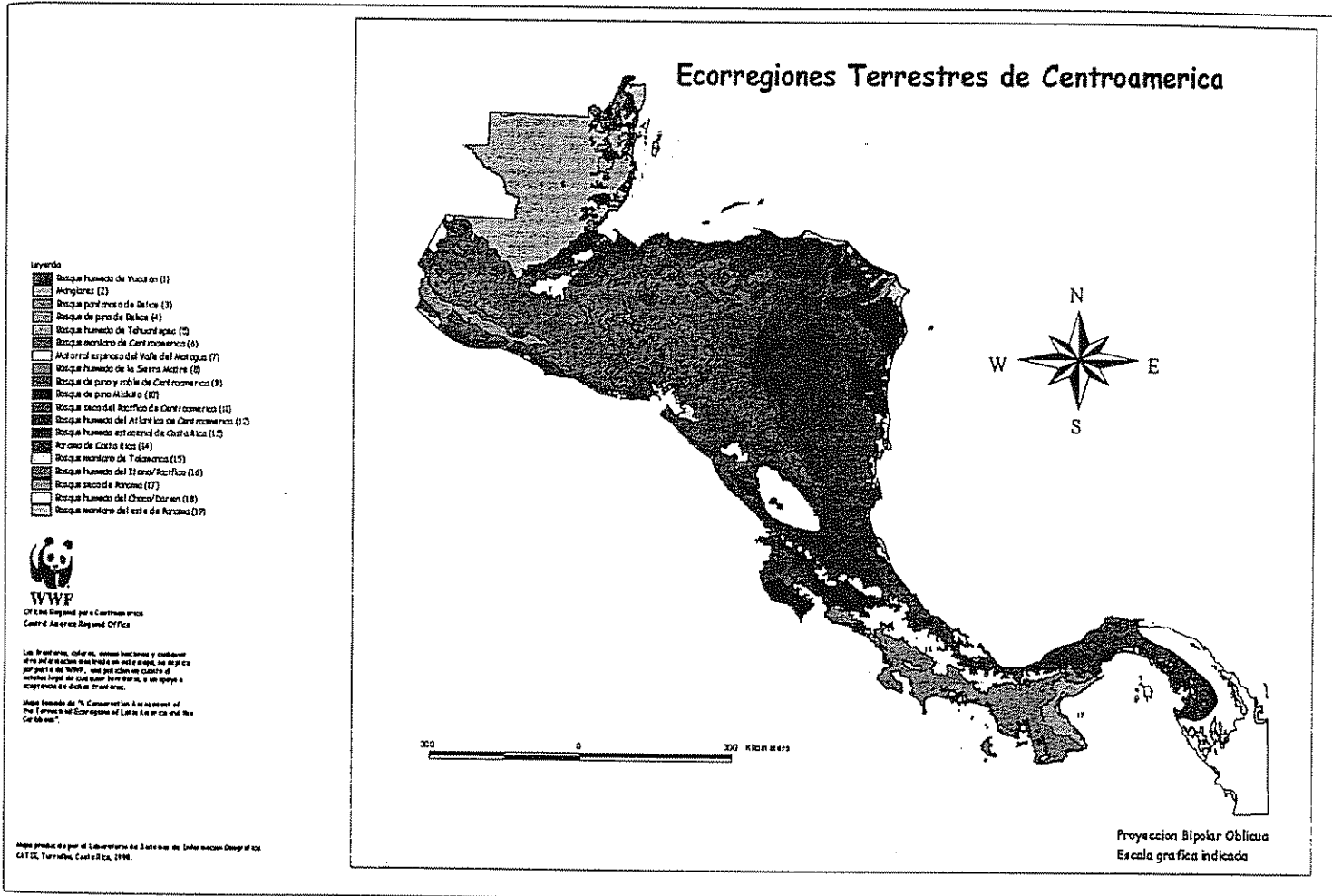
- Goodman, M.; Paterniani, E. 1969. The races of maize. 3. Choices of appropriate characters for racial classification. *Economic Botany* 23: 265-273.
- Grainige, M.; Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. New York, John Wiley. 470p.
- Mesén, F. 1994. Introducción al mejoramiento genético forestal. In Curso Regional sobre Identificación, Selección y Manejo de Rodales Semilleros, (1994, Turrialba, Costa Rica). Turrialba, C.R., CATIE/DANIDA. p.1-12.
- Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. México. Grupo editorial Iberoamérica. 589 p.
- Morton, J. 1981. Atlas of medicinal plants of Middle América. Springfield, MA, Charles C. Thomas. 389p.
- Morera, J. 1994. Recursos genéticos una opción para el desarrollo agrícola del trópico americano. In Ocampo, R ed. Domesticación de plantas medicinales en Centroamérica. Actas. CATIE (C.R.). Serie Técnica. Informe técnico no.245. p. 92-98.
- Nair, C.T. 1994. Income and employment from non-wood forest products: what do we know?. In Durst, P.; Bishop, A. eds. Beyond timber: social, economic and cultural dimensions of non-wood forest products in Asia and the Pacific. FAO/RAP Publication no.13. p. 87-96.
- Njar, VCO., Alao, T., Okogun, J., Raji, Y., Bolarinwua, A., Nduka, E. 1995. Antifertility activity of *Quassia amara*: Quassin inhibits the steroidogenesis in rat Leydig Cells In Vitro. *Planta Médica*. 61(2): 180-182.
- Núñez, R.; Dofour, M.; Anthony, F. 1993. Metodología para el aislamiento de ADN en café. In Informe anual para 1993 Programa agricultura tropical sostenible PATS. Turrialba, Costa Rica, CATIE.
- Ocampo, R. Maffioli, A. 1987. El uso de algunas plantas medicinales en Costa Rica, San José, C.R. Trejos Hnos. 200p.
- Ocampo, R. 1995. Potencial de *Quassia amara* como insecticida natural. Serie Técnica. Informe Técnico no.267. 177p.
- Okada, K. 1991. Principios sobre exploración y recolección de recursos fitogenéticos. In Castillo, R.; Estrella, J.; Tapia, C. eds. Técnicas para el manejo y uso de los recursos fitogenéticos. Quito, Ecuador. 248p.

- Ortiz, R.; Sevilla, R. 1997. Quantitative descriptors for classification and characterization of highland Peruvian maize. *Plant Genetic Resources Newsletter*. No. 110: 49-52.
- Palmberg, C.; Esquinas, J.T. 1990. The role of the United Nations agencies and other international organizations in the conservation of plant genetic resources. *Forest Ecology and Management*. 35: 171-197.
- Pittier, H. 1978. *Plantas usuales de Costa Rica*. 2 ed. San José. Editorial Costa Rica. 270p.
- Philips, W.; Rodríguez, H.; Fritz, P. 1995. *Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo*. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 183p.
- Philips, W. 1997. *Curso de biología molecular. Notas de clase metodología para la extracción de ADN*. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 13p.
- Porter, D. 1973. Family 90 Simaroubaceae. *In: Woodson, R.E.; Shery, R.W.; eds. Flora of Panamá. Annals of the Missouri Botanical Garden* 60; 23-39.
- Querol, D. 1992. *Recursos genéticos, nuestro tesoro olvidado*. Lima, Perú, 252 p.
- Ramírez, H.; Calderón, A.; Roca, W. 1993. Técnicas moleculares para evaluar y mejorar el germoplasma vegetal. *In: Roca, W.; Mroginski, L. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y Aplicaciones*. Cali, Colombia. CIAT. p.825-855.
- Ramírez, P.; Rivera, R. 1996. Identificación de geminivirus. *In: Hilje, L. Metodología para el estudio y manejo de moscas blancas y geminivirus. CATIE (C.R.). Serie materiales de enseñanza No. 37. p.30-41*
- Roak, R. 1947. Some promising insecticidal plants. *Economic Botany*. 1(4): 437-445.
- Sevilla, R., Holle, M. 1995. *Recursos Genéticos Vegetales*. Lima, Perú. 320p.
- Solís, M. 1996. Conservación de especies nativas en el contexto del manejo de bosque. *In: Memoria foro "Especies forestales nativas, una opción para la reforestación sustentable en Costa Rica*. Moravia, Costa Rica. Asociación Costarricense para el estudio de especies forestales nativas.
- Steel, R.; Torrie, J., 1993. *Bioestadística: principios y procedimientos*. 2 ed. México, Editorial Mc GRAW-HILL. 622p.
- Stoll, G. 1989. *Protección natural de cultivos en las zonas tropicales*. Weikersheim, Alemania, Editorial Margraf. 184p.

- Storfer, A. 1996. Quantitative genetics: a promising approach for the assessment of genetic variation in endangered species. *Tree* 2 (8): 343-348.
- Stutzel, T. 1995. Integrated information systems for genetic resources conservation in situ and ex situ. *In: Engels, J.M. ed. In situ conservation and sustainable use of plant genetic resources for food and agriculture in developing countries. Report of a DSE/ATSAF/IPGRI workshop, Bonn-Rottgen, Germany. p. 69-73.*
- Tromp, S. 1990. *Biometeorology. The impact of the weather and climate on humans and their environment (Animals and Plants).* Heyden, Philadelphia 346p.
- Thomas, W. 1990. The American General of Simaroubaceae and their distribution. *Acta Botánica Brasilica* 4(1): 11-18.
- Vargas, M.; Arce, J. 1986. Caracterización de la colección de *Capsicum* spp. del CATIE, en Turrialba, Costa Rica. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 10p.
- Vásquez, N. 1995. Los estudios histológicos en apoyo a la investigación. *In: Programa de investigación científica. II Semana científica. CATIE, Turrialba; Costa Rica. p 16-18.*
- 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 Mag. Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica, CATIE. 174p.
- Villalobos, R.; Ocampo, R.; Marmillod, D. 1995. Distribución de *Quassia amara*, un arbusto insecticida natural, en Costa Rica. *In: Programa de Investigación Científica II Semana Científica, Resúmenes. 4-7 de Diciembre de 1995. CATIE. p39-40.*
- Villalobos, R., Ocampo, R. 1995. Especies forestales con productos diferentes a la madera. *In: Villalobos, R. Ocampo, R. eds. Productos no maderables del bosque en Centroamérica y el Caribe. Actas. CATIE (C.R.). Serie Técnica. Eventos Especiales no. 1: p.5-19.*
- Williams, L. 1981. The useful plants of Central América. *Ceiba* 24 (1-2): 304.
- Zobel, B.; Talberth, J. 1984. Applied forest tree improvement. North Carolina, North Carolina State University. p.40

ANEXOS

ANEXO 1 A



Ubicación de los sitios dentro de las ecoregiones de América Central

ANEXO 2A

INFLORESCENCIA										
Epoca de floración (MMAA)										
Largo del pedúnculo (mm)										
Color de las flores										
Número de pedicelos										
Número de flores										
INFRUTESCENCIA										
Epoca de fructificación (MMAA)										
Número de ginoforos en racimo										
Número de frutos por ginoforo										
Color del ginoforo										
FRUTO										
Color										
Longitud (mm)										
Diámetro (mm)										
Forma del fruto										
Forma de la base del fruto										

COLECTA		
Número de hojas colectadas	Jóvenes	Adultas
Observaciones		

Número de tallos colectados	Diámetro 1.0	Diámetro 2.5	Diámetro 3.0
Observaciones			

Número de frutos colectados
Observaciones

ANEXO 3A

CONTEO DE VASOS						
LUGAR		PARCHE	NUMERO DE VASOS EN 10 CAMPOS en 25 X	VASOS	Promedio No	Prom vaso/población
Kekoldi			(en 10 campos en 25X)		vasos/parche	(en 10 campos en 25X)
Palma Quemada						
La Pacífica						
La Lupe						
Santa Rosa						
El salado						

ANEXO 3A

LUGAR	Parche	DISTRIBUCION DE LOS TAPONAMIENTOS EN LOS TEJIDOS			Por placa
		Es uniforme en el tejido	Cercano a la médula	Lejano a la médula	
La Lupe	1				
	2				
	3				
	4				
Santa Rosa	1				
	2				
	3				
	4				
El salado	1				
	2				
	3				
	4				
IZABAL	1				

ANEXO 4A

Angulo de inserción del peciolo foliar

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	3642.832576	9.33	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	956.105834	2.45	0.0010
Error	720	390.479520		
Total	742			

C.V. 30.82207

Ancho de la hoja

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	121694.79070	50.19	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	14704.03401	6.06	0.0001
Error	720	2424.70402		
Total	742			

C.V. 23.36288

Largo de la hoja

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	160649.71443	125.44	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	15011.07205	11.72	0.0001
Error	718	1280.6940		
Total	742			

C.V. 12.13310

Angulo de inserción del folíolo

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	91.15209333	6.25	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	32.49217647	2.23	0.0140
Error	52	14.5934872		
Total	74			

C.V. 7.332890

Largo del folíolo

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	3012.298307	25.90	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	386.123980	3.32	0.0004
Error	52	116.311051		
Total	74			

C.V. 8.544776

Ancho del folíolo

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	296.5875400	10.50	0.0001
PARCHE(LUGAR)	17	89.8250294	3.18	0.0007
Error	52	28.2590000		
Total	74			

C.V. 11.34135

Largo del pedicelo

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	18040.13757	2.36	0.0969
PARCHE(LUGAR)	8	12597.58758	1.65	0.1128
Error	219	7646.17042		
Total	229			

C.V. 39.40081

Número de pedicelos

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	495.7439995	9.30	0.0001
PARCHE(LUGAR)	8	402.9844365	7.56	0.0001
Error	219	53.3311114		
Total	229			

C.V. 31.60202

Número de pedicelos presentes

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	941.5431743	18.90	0.0001
PARCHE(LUGAR)	8	56.1357420	1.13	0.3460
Error	219	49.8070556		
Total	229			

C.V. 57.31655

Número de pedicelos ausentes

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	120.4971859	1.99	0.1389
PARCHE(LUGAR)	8	335.9018504	5.55	0.0001
Error	219	60.4885067		
Total	229			

C.V. 72.04230

Número de ginoforos

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	2.33797240	1.54	0.2251
PARCHE(LUGAR)	7	2.56455026	1.68	0.1338
Error	51	1.52222222		
Total	60			

C.V. 57.89293

Frutos por ginoforo

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	3.40738204	3.65	0.0288
PARCHE(LUGAR)	7	0.83591403	0.90	0.5123
Error	123	0.93333134		
Total	132			

C.V. 21.13324

Número de frutos ausentes

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	24.19668544	15.90	0.0001
PARCHE(LUGAR)	7	1.78772805	1.17	0.3220
Error	123	1.52153744		
Total	132			

C.V. 68.07316

Número de frutos presentes

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	23.77915206	17.58	0.0001
PARCHE(LUGAR)	7	1.79743153	1.33	0.2422
Error	123	1.35244583		
Total	132			

C.V. 81.83701

Número de frutos abortados

Fuente de variación	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	2	15.00969040	12.34	0.0001
PARCHE(LUGAR)	7	2.87516391	2.36	0.0267
Error	122	1.21640917		
Total	132			

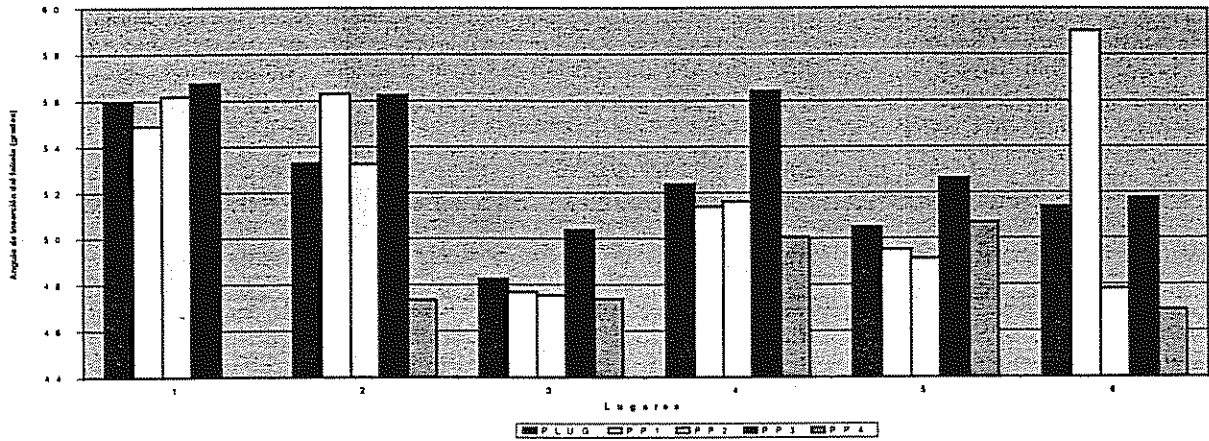
C.V. 79.99123

ANEXO 5A

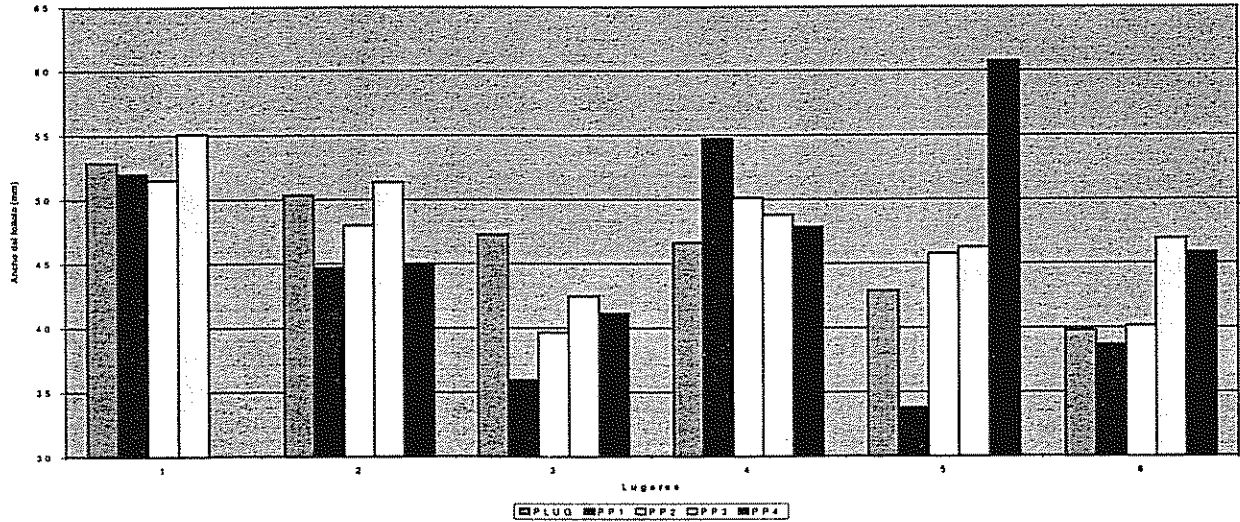
PP=Promedio parche, LUG= lugar

Lugares: 1=Kekoldi, 2=Palma Quemada, 3=La Pacifica, 4=La Lupe, 5=San Antonio Cabrera, 6=El Salado.

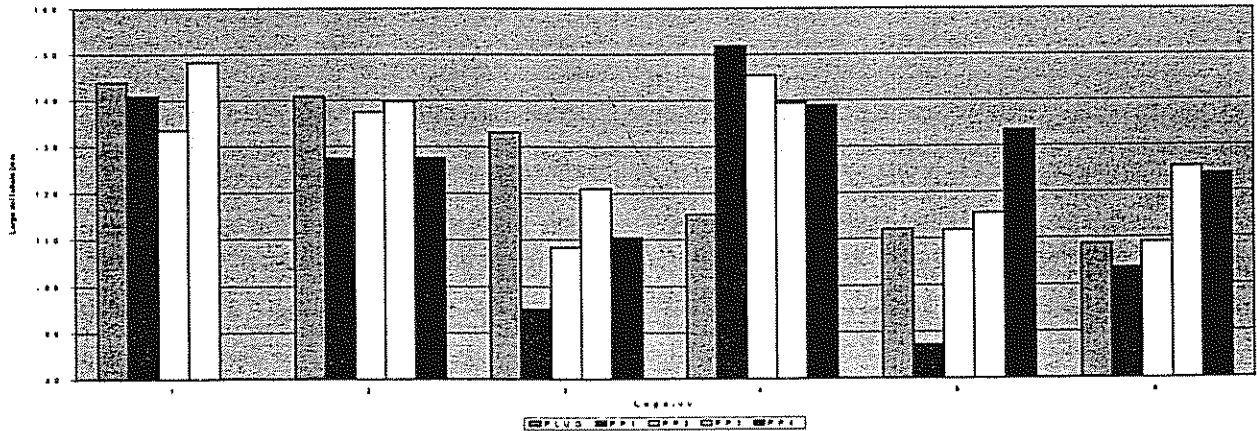
ANGULO DE INSERCIÓN



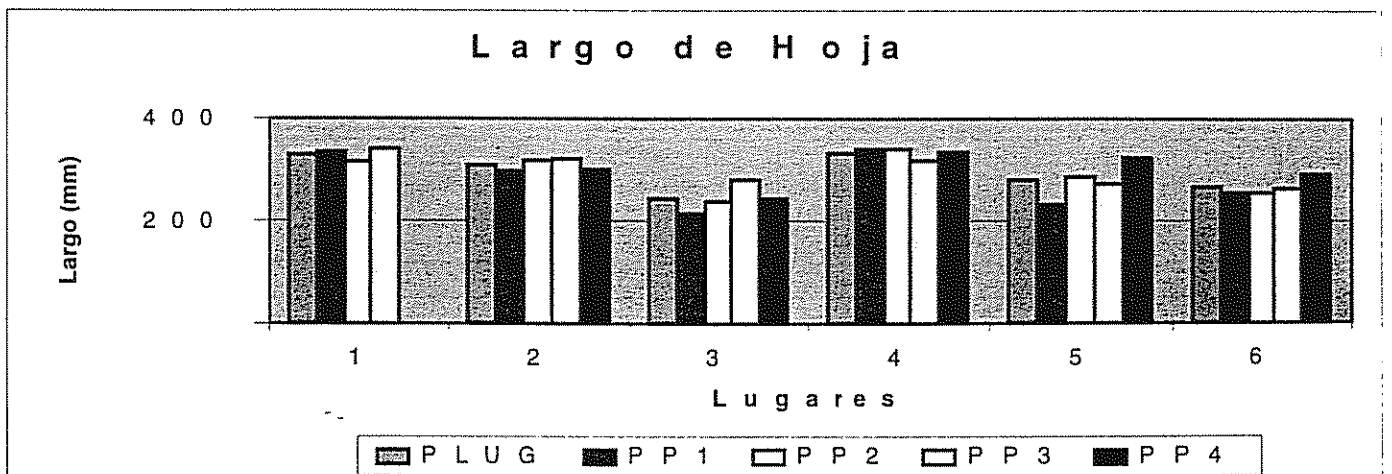
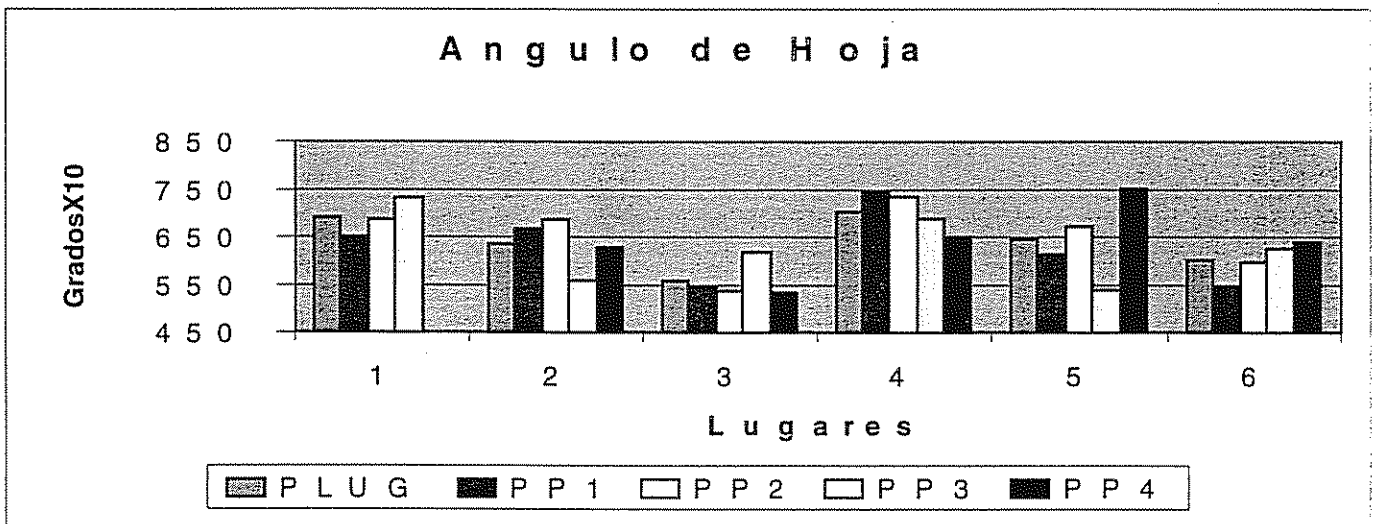
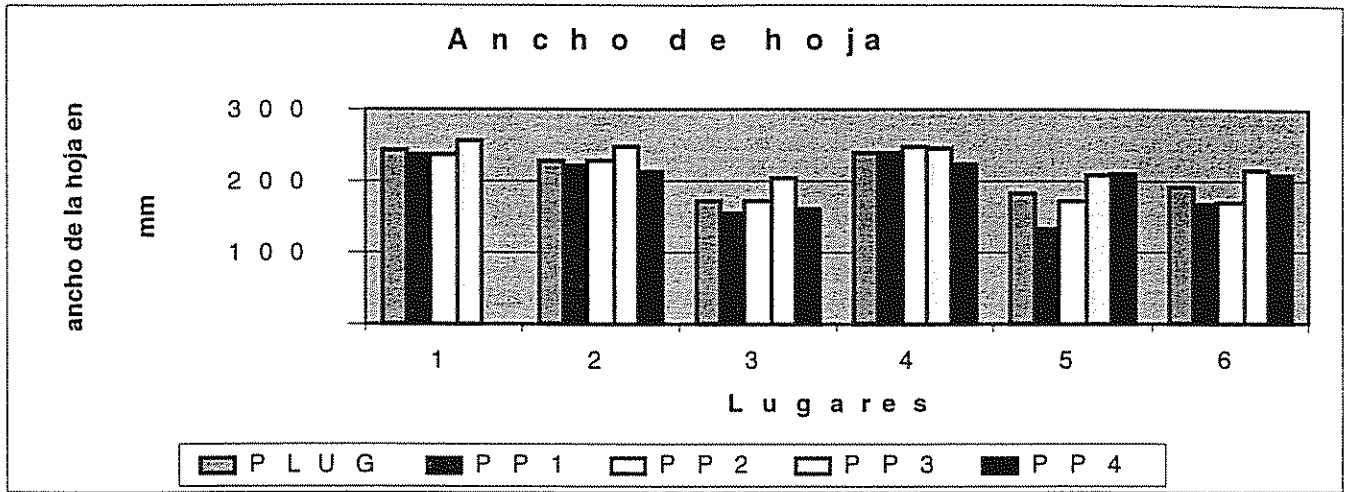
ANCHO DEL FOLIULO



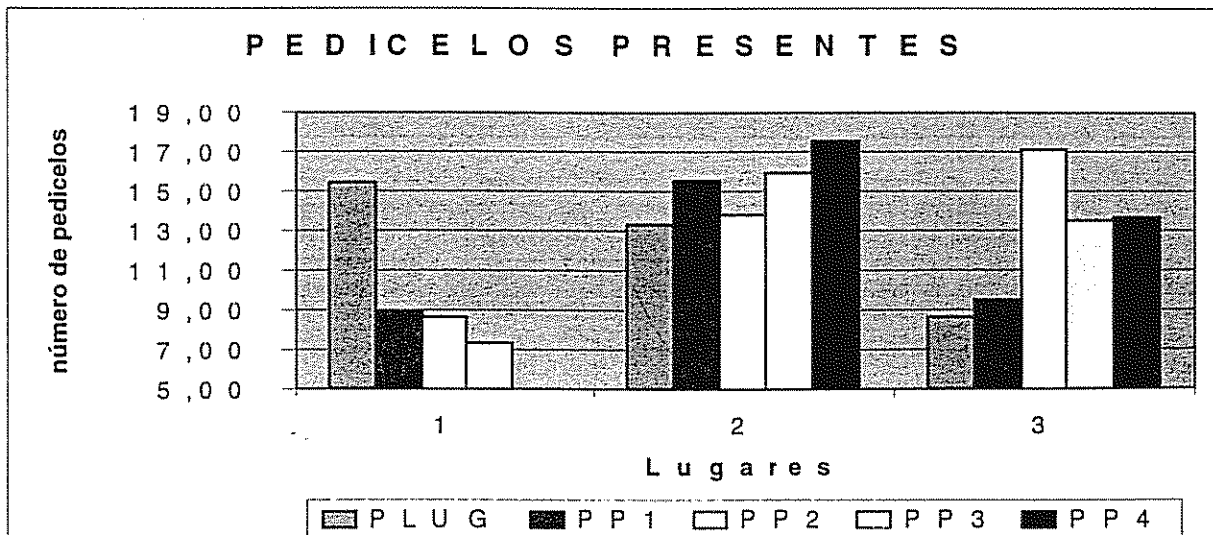
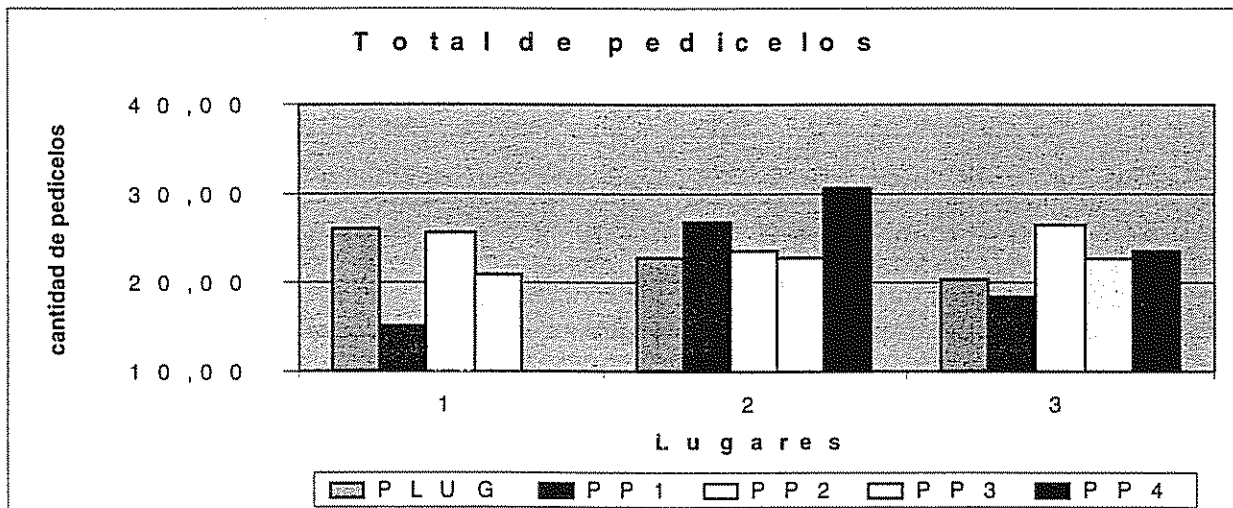
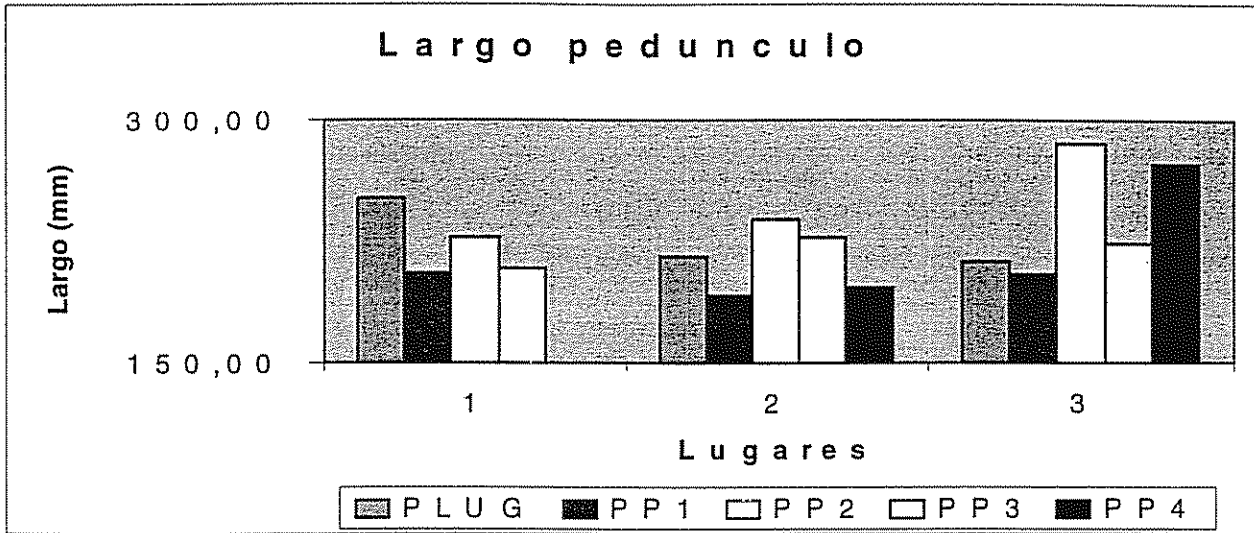
LARGO DEL FOLIULO



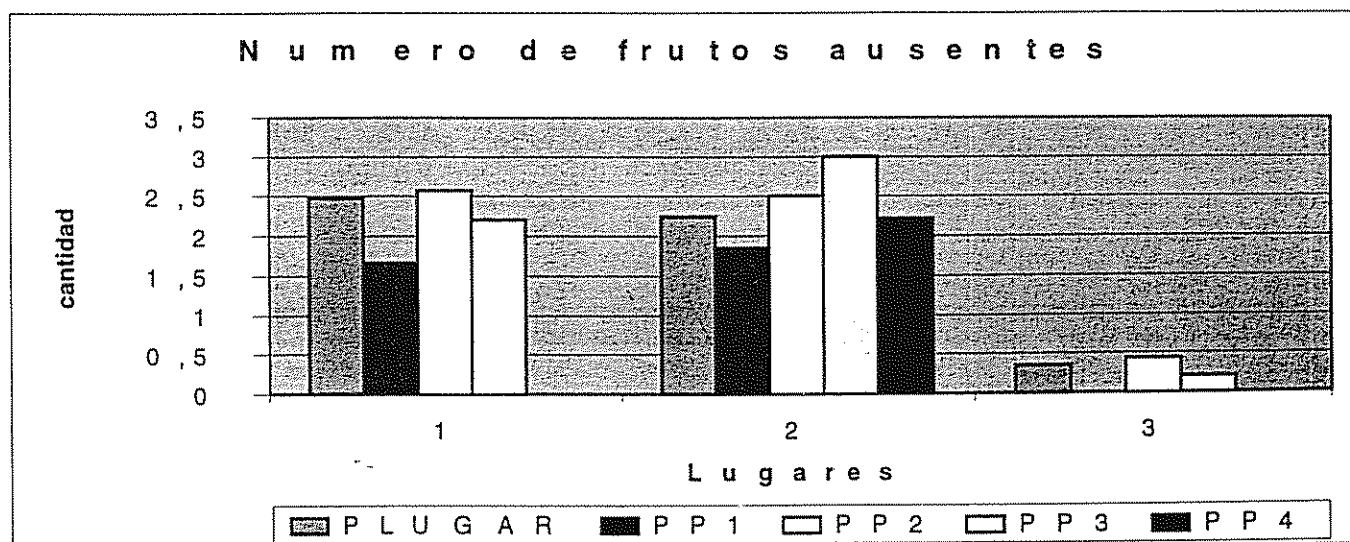
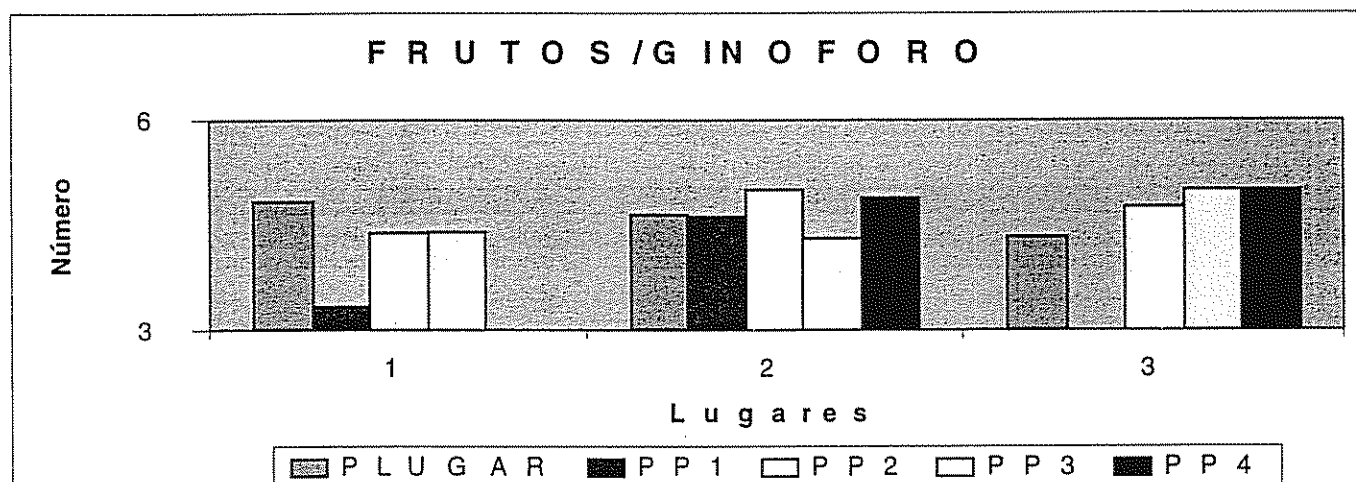
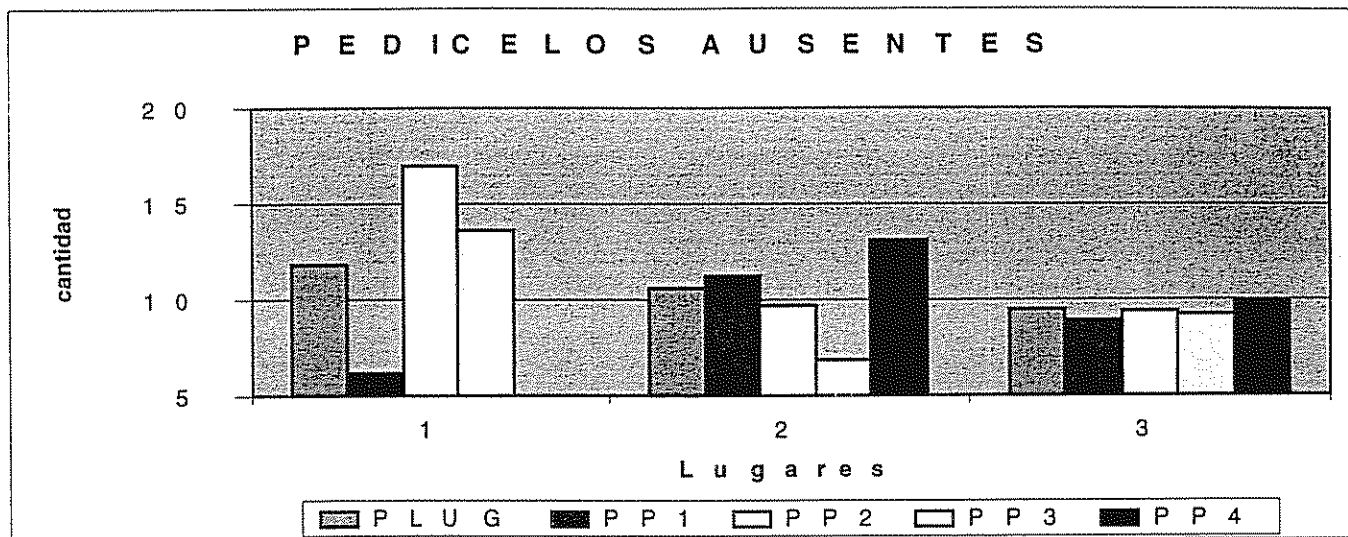
ANEXO 5A



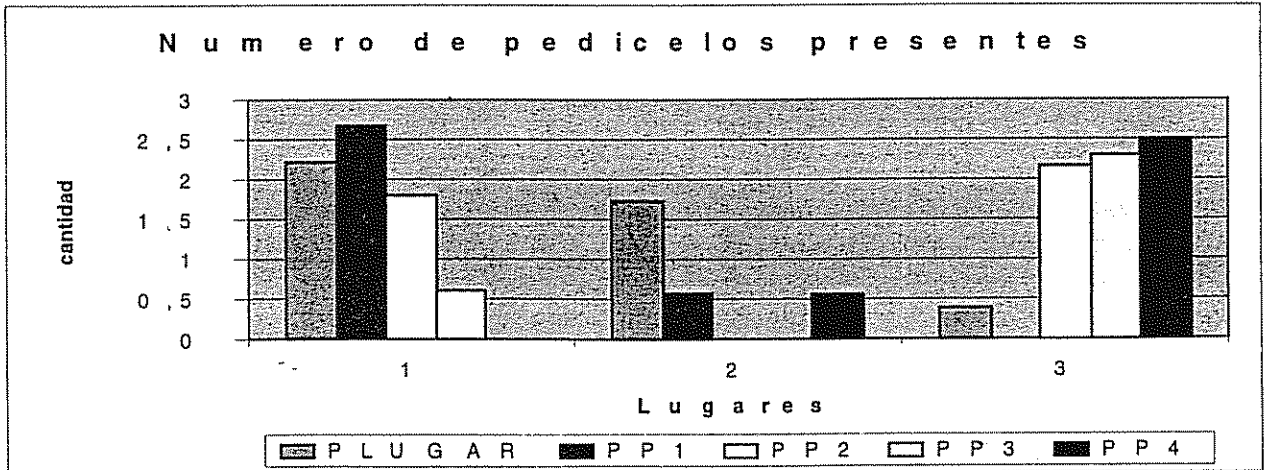
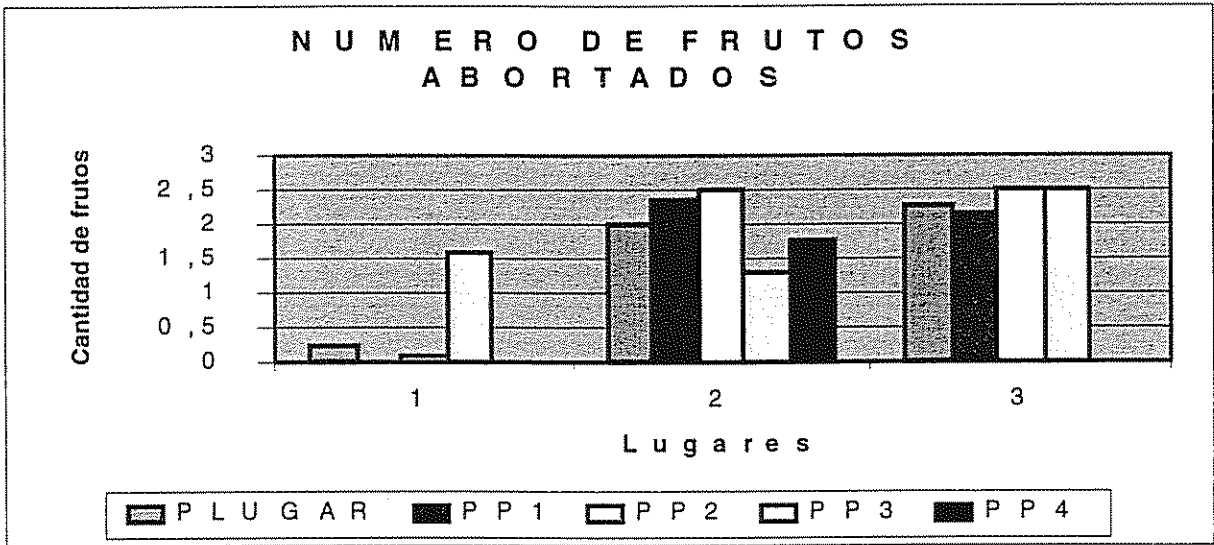
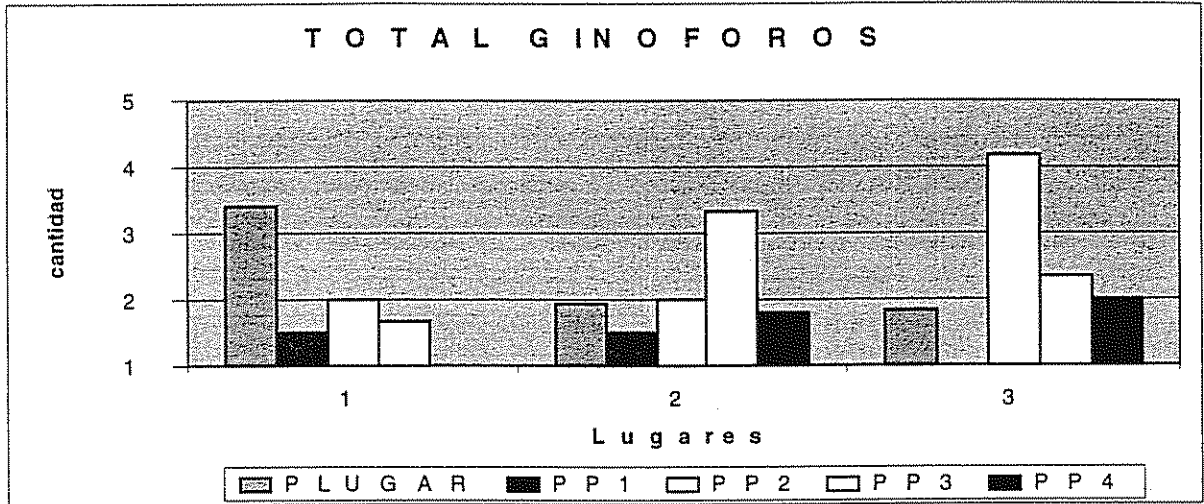
ANEXO 5A



ANEXO 5A



ANEXO 5A



ANEXO 6A

Promedio de vasos

FUENTE DE VARIACION	GL	CME	F	Pr > F
LUGAR	5	48.3	1.44	0.2593
Error	17	33.4		
TOTAL	22			

C.V. 19.19118

Agrupamiento Tukey para el promedio de vasos

LUGAR	Agrupamiento Tukey	Mean
3	A	34.450
6	A	34.100
2	A	29.933
1	A	29.025
5	A	27.150
4	A	26.150

Prueba de Chi-cuadrado, características cualitativas

CARACTERISTICA	Kruskal-Wallis Test (Chi-Square Approximation)	GL	Nivel de significancia a 0.001
EVIDENCIA DEL ANILLO DE CRECIMIENTO	CHISQ = 10.404	5	Prob > CHISQ = 0.0646
MICELIO PRESENTE	CHISQ = 13.299	5	Prob > CHISQ = 0.0207
DISTRIBUCION UNIFORME DE LOS TAPONAMIENTOS	CHISQ = 12.013	5	Prob > CHISQ = 0.0346
DISTRIBUCION DE LOS VASOS CERCANA A LA MEDULA	CHISQ = 3.9286	5	Prob > CHISQ = 0.5597
DISTRIBUCION DE LOS VASOS LEJANA A LA MEDULA	CHISQ = 3.9286	5	Prob > CHISQ = 0.5597
TAPONAMIENTO	CHISQ = 11.960	5	Prob > CHISQ = 0.0353
PARENQUIMA AXIAL	CHISQ = 8.0093	5	Prob > CHISQ = 0.1557
PARENQUIMA BASAL	CHISQ = 8.8542	5	Prob > CHISQ = 0.1150
TOTAL		40	

Anexo 7A

PROTOS COLOS UTILIZADOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION DE ADN DE *Quassia amara*

METODO CTAB-MINIPREPARACIONES *

Modificado por Amanda Gillies

23 de enero de 1988. Traducido y adaptado por W. Phillips

Nota: Es conveniente usar guantes durante todo el proceso para evitar las contaminaciones. Varios de los reactivos usados son muy peligrosos (CTAB, Cloroformo, PVP y mercaptoetanol)

Macere muy bien 0,2 g de hojas en un mortero con N líquido. Coloque el polvo en un eppendorf de 1,5 ml y agregue 100 ul de buffer 2X CTAB. Macere fuertemente con un pistilo.

Adicione 900 ul de buffer y luego 2 µl de mercaptoetanol (en la cámara de gases). Cierre la tapa, agite con el vortex hasta uniformizar.

Incube en Baño María a 65°C por 30 minutos. Deje enfriar 4 minutos.

Adicione 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol a t° ambiente (cámara de gases) y mezcle fuertemente con el vortex. Microcentrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos.

Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repita el paso anterior.

Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una micropipeta de 1 ml. Llene el tubo con isopropanol (-20°C) y mezcle ligeramente para precipitar el ADN. Deje reposar 120 minutos en el congelador.

Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos. Elimine el alcohol.

Adicione 1.000 ul de buffer de lavado (76% etanol y 10 mM de acetato de amonio) y deje reposar por 20 minutos a t° ambiente.

9. Centrifugue a 13.000 rpm por 5 minutos

*Harris, S.A. 1996. *Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols*. Oxford, England. 47 p.

10. Elimine el buffer de lavado invirtiendo el tubo y deje secar al aire.

Adicione a cada tubo 300 μ l de mezcla (10 ml de RNAm a 100 mg/ml mas 300 μ l TE 0.1 mM pH 2)

12. Agregue 100 μ l de TE (0.5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspenda agitando levemente

Buffer de extracción 2X CTAB Preparación para 100 ml:

100 mM Tris-HCl pH 8.0

20 mM EDTA, Disodium

1.4 M NaCl

2% (P/V) CTAB

1% PVP

10 ml de solución 1M

4 ml de una solución 0.5 M, a pH 8

8.2 gr

2 gr

1 gr (mezclar bien los ingredientes, el pH debe quedar en 8.0)

METODO CTAB-MINIPREPARACIONES

Modificado por Olman Quiros

6 de enero de 1988. Traducido y adaptado por W. Phillips

Nota: Es conveniente usar guantes durante todo el proceso para evitar las contaminaciones. Varios de los reactivos usados son muy peligrosos (CTAB, Cloroformo, PVP y mercaptoetanol)

Macere muy bien 0,2 gr de hojas en un mortero con N líquido. Coloque el polvo en un eppendorf de 1,5 ml.

Adicione 1ml de buffer de extracción "2X CTAB" y luego 2 µl de mercaptoetanol al 0,2% (en la cámara de gases). Cierre la tapa, agite con el vortex hasta uniformizar.

Incube en Baño María a 65°C por una hora. Deje enfriar el tubo a T° ambiente.

Adicione 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol (cámara de gases) y mezcle fuertemente con el vortex. Microcentrifugue a 14.000 rpm por 2 minutos.

Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repita el paso anterior.

Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una pipeta Pasteur. Llene el tubo con etanol al 70% (-20°C) y mezcle ligeramente para precipitar el ADN. Deje reposar durante toda la noche en el congelador.

Centrifugue a 14.000 rpm por 2 minutos. Elimine el alcohol y deje secar bien los tubos colocándolos boca abajo sobre un papel.

Adicione 500 ul de etanol al 70% y mezcle suavemente. Centrifugue a 5.000 rpm por 2 minutos. Elimine el alcohol y seque los tubos sobre un papel.

Agregue 250 ul de TE (0,5 M, pH 7.4 y oscuridad) y resuspenda agitando leve con el vortex.

Centrifugue a 5.000 rpm y transfiera el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una pipeta. Coloque los tubos a 4°C hasta que se requieran.

Buffer de extracción 2X CTAB

100 mM Tris-HCl pH 8.0

20 mM EDTA, Disodium

1,4 M NaCl

2% (P/V) CTAB

1% PVP

*Harris, S.A. 1996. *Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols*. Oxford, England. 47 p.

AISLAMIENTO DE ADN METODO WISCONSIN *

13 de noviembre de 1997. W.Phillips

- 1 Pese la muestra de hojas limpias sin nervaduras (0,2g jícama, y quassia amara o 0,3g caoba). Coloque en un eppendorf y macere con nitrógeno líquido.**
- 2 Adicione 50 μ l de buffer de extracción a cada tubo y termine de macerar.
- 3 Agregue 450 μ l de buffer de extracción y agite con el vortex. Golpee el tubo para que su contenido se vaya al fondo.
- 4 Incube inmediatamente en el baño María por 45 minutos a 65°C. Enfriar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
- 5 Agite con vortex y microcentrifugue a 13.000 rpm durante 3 minutos.**
6. Transfiera el sobrenadante a otro eppendorf y llene con una solución 6:1 de 95% de etanol y 7,5 M de acetato de amonio. Mezcle invirtiendo el tubo cuidadosamente y coloque los eppendorf 1 hora a -20°C para precipitar el ADN

Reactivo	1 muestra	4 muestras	8 muestras	12 muestr as	16 muestr as
Etanol 95%	1ml	4ml	8ml	12ml	16ml
Acetato de amonio 7.5 M (PM=77,09 g \Rightarrow)	167ul	668ul	1,336ml	2ml	2,7ml
Volumen final					

- 7. Microcentrifugue a 13.000 rpm por 2 minutos y vote el sobrenadante. Lave el pellet con etanol al 70% agitando suavemente.**
8. Nuevamente se centrifuga y se elimina el alcohol colocando los tubos boca abajo sobre una toalla de papel para que escurra el líquido. Si el pellet está suelto, agite los tubos otra vez y centrifugue de nuevo.
- 9. Adicione a cada muestra 222 μ l de la siguiente mezcla: 22 μ l de RNAsa A +200 μ l de TE 0,1 mM pH 8,0. Agite suavemente hasta resuspender el pellet. LA RNAsa se mantiene en una solución madre de 100 μ g/ml a -20°C.**

Reactivo	1 muestra	4 muestras	8 muestras	12 muestras	16 muestras
RNasa A 100 µg/ml	22	88	176	264	352
TE 0,1 mM	200	800	1600	2400	3200

10. Incube a 37°C por 30 minutos para digerir el ARN.

AQUÍ SE PUEDE DETENER EL PROCESO Y CONTINUARLO DESPUES, COLOCANDO LAS MUESTRAS A 5°C.

11. Centrifugue a 14.000 rpm brevemente para repeletear cualquier residuo sólido no disuelto.

12. Transfiera el supernatante a un tubo limpio y reprecipite el ADN con un volumen similar de isopropanol (-20°C). Mezcle permitiendo que el ADN precipite a temperatura ambiente por al menos 30 minutos.

13. Agite bien para disolver el precipitado antes de que forme pellet. Centrifugue a 3.000 rpm por 5 minutos.

14. Ponga boca abajo los tubos sobre una toalla de papel. Tenga cuidado de no botar los pellets.

15. Haga dos lavados con etanol 70% (aprox. 1 ml por muestra), centrifugando después de cada uno de ellos a 3.000 rpm por 5 minutos. Elimine el alcohol colocando boca abajo los tubos sobre una toalla de papel.

Rehidrate adicionando 1 ml de TE 1M por muestra. Agite golpeando con el dedo el tubo. Guarde en el congelador.

Estime la concentración del ADN.

**Jhingan, A. 1992. A novel technology for DNA isolation. Methods of molecular biology 3: 15-22*

METODO CTAB-MINIPREPARACIONES

5 Octubre de 1997, Traducido y adaptado por W.Phillips*

Pese el segmento de hoja (0.12gr) y colóquelo en el fondo de un Eppendorf. Sumerja el Eppendorf dos veces seguidas en nitrógeno líquido y macere con la ayuda de un pistilo de plástico. En caso necesario se puede sumergir de nuevo el eppendorf pero esta vez con la tapa cerrada para evitar contaminar el nitrógeno líquido.

Adicione 100 µl de buffer de extracción "2X CTAB" y termine de macerar hasta formar una solución homogénea.

Añada 900 µl de buffer "2X CTAB" y luego 2 µl de mercaptoetanol al 0,2% (en la cámara de gases). Cierre la tapa, agite suavemente con el vortex hasta uniformizar la mezcla. Incube en Baño María a 65°C por 45 minutos.

Deje enfriar el tubo a temperatura ambiente. Adicione 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol (cámara de gases) y mezcle fuertemente con el vortex para formar momentáneamente una sola fase. Microcentrifugue a 13.000 rpm por 2 minutos.

Transfiera cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio. Adicione de nuevo 400 µl de la solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol y mezcle fuertemente con el vortex por 2 minutos.

Transfiera el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una pipeta Pasteur. Llene el tubo con etanol 70% y mezcle ligeramente para precipitar el ADN. Dejar reposar por 30-60 minutos en el congelador. Centrifugue a 13.000 rpm por 2 minutos. Eliminar el alcohol y seque los tubos.

Adicionar 500 µl de etanol al 70% (20 °C) centrifugue a 5000rpm por 2 minutos. Eliminar el alcohol y seque los tubos.

En forma inmediata, agite levemente. Centrifugue de nuevo a 13.000 por 2 minutos. Remueva el sobrenadante y coloque los tubos boca abajo sobre un papel hasta que se sequen bien.

Adicione a cada muestra 250 µl de TE (0,5 M, pH 7.4 y mantenido en la oscuridad) mezcle levemente en vortex. Centrifugue a 5000rpm y pase el sobrenadante con una pipeta a un tubo limpio

*Harris, S.A. 1996. *Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols*. Oxford, England. 47 p.

Buffer de extracción 2X CTAB

100 mM Tris-HCl pH 8.0
20 mM EDTA, Disodium
1,4 M NaCl
2% (P/V) CTAB
1% PVP

Buffer de lavado Para eliminar el CTAB

76% Etanol
10 mM Acetato de Amonio

*Laboratorio de Biología Molecular CATIE Turrialba. AA 7170 Costa Rica.

AISLAMIENTO DE ADN METODO CACAO MODIFICADO

12 de agosto de 1997. W Phillips*

1. Ponga a enfriar a 0°C la centrifuga grande (rotor ja17) y a calentar el baño María a 65°C
2. **Prepare el buffer de extracción y colóquelo en hielo. Si el buffer ha sido preparado con anterioridad, corrobore que su pH sea 7.0.**
3. Ponga en hielo un recipiente de boca ancha por cada muestra a extraer. Cada recipiente debe contener 80 ml de buffer de extracción.
4. **En un mortero limpio, macere 3 g de hojas limpias sin nervaduras con nitrógeno líquido. Ponga el polvo en el recipiente con el buffer de extracción, tape y agite.**
5. Filtre a través de dos capas de gaza limpia dejando caer el líquido en un recipiente de boca ancha oscuro. Transvase a un tubo de policarbono de 40 ml (no de polipropileno pues se disuelve con el cloroformo que será usado posteriormente).
6. **Centrifugue a 3.000 rpm y 4°C por 20 minutos (Centrifuga Grande, rotor ja17).**
7. Coloque los tubos en hielo. Con una pipeta Pasteur elimine en forma muy cuidadosa el sobrenadante sin disturbar el precipitado.
8. **Resuspenda el precipitado en 3200 µl de "buffer" de extracción.**
9. Coloque los tubos fuera del hielo y adicione 4.000 µl de "buffer" de lisis y luego 800 µl de sarcosil al 5 % (peso:volumen). Tape y mezcle con movimiento circular.
Tanto el "buffer" de lisis como el sarcosil se almacenan a temperatura ambiente. Cuando el sarcosil se pesa, es conveniente usar un protector en la boca.
10. **Incube los tubos en baño María a 65°C durante 30-90 min.**
El tiempo que permanecen los tubos en el baño María, dependerá de la coloración que presente la solución, ya que si empieza a tomar un color café, indica que se está produciendo oxidación, por lo que los tubos deben colocarse inmediatamente en hielo picado.
11. Adicione 2.500 µl de una solución cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), tape y agite invirtiendo el tubo por lo menos cinco minutos. La solución debe presentar un color verde blancuzco.

Reactivo	1 muestra	8 muestras	12 muestras	16 muestras
Cloroformo	2.396 μ l	19.2 ml	28.8 ml	38.4 ml
Alcohol isoamílico	104 μ l	832 μ l	1.248 μ l	1.664 μ l
Volumen final	2.5 ml	20 ml	30 ml	40 ml

12. Centrifugue los tubos por 10 minutos a 8.500 r.p.m. y 4°C. Ponga a enfriar en hielo un set de tubos de vidrio.
13. Con una pipeta Pasteur o con una pipeta con dispensador, transfiera cuidadosamente la fase acuosa superior a los tubos de vidrio. Es muy importante no tomar ninguna porción correspondiente a la interfase que incluye los restos sólidos ni la fase de cloroformo. En todo caso es mejor tomar una cantidad menor de líquido antes de cometer este error.
14. Agregue un volumen igual de isopropanol (-20°C). Agite suavemente con movimiento circular para precipitar el ADN. Deje reposar los tubos en el congelador toda la noche.
15. Saque los tubos del congelador y colóquelos en hielo picado. Con una pipeta Pasteur a la que se le ha doblado su punta con calor a manera de garfio, extraiga el ADN rápidamente y colóquelo en un Eppendorf de 1,5 ml.
16. Llene el eppendorf con etanol al 70% para lavar el ADN. Luego microcentrifugue durante tres minutos y decante para eliminar el alcohol. Coloque el eppendorf sobre una toalla de papel hasta que el alcohol se evapore totalmente.
17. Resuspenda el ADN en 1.000 μ l de TE 1 M pH=7,2

Cuadro 1. Preparación del buffer de extracción (45 ml/muestra)

Ingrediente	180 ml (4 muestras)	360 ml (8 muestras)
0.5 M EDTA pH8	179 μ l	320 μ l
1M Tris-HCl pH8	17.8 ml	36 ml
Bisulfito de sodio (6 h antes)	0,89 g	1,76 g
Afore con agua destilada		
Ajuste el pH a 7.0 con NaOH 10M		

Cuadro 2. Preparación del buffer de lisis (2 ml/muestra)

Ingrediente	25 ml (12 muestras)	50 ml (25 muestras)
0.5 M EDTA pH8	2,5 ml	5 ml
1M Tris-HCl pH8	5 ml	10 ml
NaCl	2,9 g	5,8 g
CTAB*	0,5 g	1 g
Afore con agua destilada		
Ajuste el pH a 7.0 con NaOH 10M		

Para disolver el CTAB primero se debe mezclar con un poco de agua destilada y calentarlo a temperatura intermedia con agitación constante hasta su disolución (aprox. 3 horas).

* Laboratorio de Biología Molecular CATIE. Turrialba. Costa Rica

**AISLAMIENTO DE ADN
METODO CACAO MODIFICADO-
MINIPREPARACIONES**

Mayo de 1997

1. Prepare y coloque en hielo el buffer de extracción (1,5 ml/muestra).
2. **Pese 0,6 g de hojas limpias sin nervaduras. Coloque la muestra en una cápsula plástica.**
3. Introduzca la cápsula dentro del nitrógeno líquido y macere la muestra. Repita el procedimiento.
4. **Transvase el polvo obtenido a un tubito plástico de 2ml con ayuda de un miniembudo. Adicione 500 µl de buffer de extracción y termine de macerar. Agregue 500 µl de buffer más, agite y golpee el tubo para ubicar su contenido en el fondo del mismo.**
5. Centrifugue a 3.500 rpm y 4°C por 12 minutos (Centrifuga nueva).
6. **Elimine el sobrenadante y adicione 400 µl de buffer de extracción, 500 µl de buffer de lisis y 100 µl de sarcosil al 5 % (peso:volumen). Tape y mezcle con movimiento circular.**

Tanto el "buffer" de lisis como el sarcosil se almacenan a temperatura ambiente. Cuando el sarcosil se pesa, es conveniente usar un protector en la boca.

7. Incube los tubos en baño María a 65°C durante 30-60 min.

El tiempo que permanecen los tubos en el baño María, dependerá de la coloración que presente la solución, ya que si empieza a tomar un color café, indica que se está produciendo oxidación, por lo que los tubos deben colocarse inmediatamente en hielo picado.

8. Adicione 400 μl de una solución fresca cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), tape y agite invirtiendo el tubo por al menos cinco minutos. La solución debe presentar un color verde blanuzco.

Reactivo	1 muestra	8 muestras	12 muestras	16 muestras
Cloroformo	384 μl	3.1 ml	4.6 ml	6.2 ml
Alcohol isoamílico	16 μl	128 μl	192 μl	256 μl
Volumen final	0,4 ml	3,2 ml	4,8 ml	6,4 ml

9. Centrifugue los tubos por 10 minutos a 8.500 r.p.m. y 4°C.

10. Con una pipeta Pasteur transfiera la fase líquida a un tubito de 2 ml.

11. Llene el tubo con isopropanol a -20°C. Agite suavemente con movimiento circular para precipitar el ADN. Deje reposar los tubos en el congelador toda la noche.

12. Saque los tubos del congelador y colóquelos en hielo picado. Con una pipeta Pasteur a la que se le ha doblado su punta con calor a manera de garfio, extraiga el ADN rápidamente y colóquelo en un Eppendorf de 1,5 ml.

13. Adicione etanol al 70% para lavar el ADN. Luego microcentrifugue durante tres minutos y decante para eliminar el alcohol.

14. Resuspenda el ADN en 300 μl de TE 1 M pH=7,2.

Cuadro 1. Preparación del buffer de extracción (1,5 ml/muestra)

Ingrediente	50 ml (30 muestras)	250 ml (160 muestras)
0.5 M EDTA pH8	47,6 μl	238 μl
1M Tris-HCl pH8	5 ml	25 ml
Bisulfito de sodio (6 h antes)	0,25 g	1,25 g
Afore con agua destilada		
Ajuste el pH a 7.0 con NaOH 10M		

Cuadro 2. Preparación del buffer de lisis (0,5 ml/muestra)

Ingrediente	5 ml (10 muestras)	25 ml (50 muestras)
0.5 M EDTA pH8	0,5 ml	2,5 ml
1M Tris-HCl pH8	1 ml	5 ml
NaCl	0,6 g	2,9 g
CTAB*	0,1 g	0,5 g
Afore con agua destilada		
Ajuste el pH a 7.0 con NaOH 10M		

* Para disolver el CTAB primero se debe mezclar con un poco de agua destilada y calentarlo a temperatura intermedia con agitación constante hasta su disolución (aprox. 3 horas).

AISLAMIENTO DE ADN METODO WISCONSIN MODIFICADO

15 de Mayo de 1997. W.Phillips

- 1 Pese 2 g de hojas limpias sin nervaduras. Coloque la muestra en un mortero y adicione nitrógeno líquido para molerlas.
- 2 Transvase el polvo resultante a un tubo plástico con ayuda de un miniembudo.
- 3 Adicione a la muestra 3.200 μ l de buffer de extracción y termine de macerar con el homogenizador. Cerciorese que la muestra está uniforme. Golpee el tubo para que su contenido se vaya al fondo.
- 4 Coloque inmediatamente en el baño María por un mínimo de 30 minutos a 65°C.
- 5 Microcentrifugue a 10.000 rpm durante 10 minutos para separar los residuos de tejidos del extracto que contiene el ADN.
6. Transfiera el extracto acuoso a un tubo pyrex de 15 ml y precipite los ácidos nucleicos llenando los tubos con una mezcla 6:1 de 95% de etanol y 7M de acetato de amonio (aprox. 4 ml por muestra de 2g). Mezcle para evitar la separación en dos fases. La mezcla se precipita a temperatura ambiente por no más de 30 minutos.

Reactivo	1 muestra	4 muestras	8 muestras	12 muestr as	16 muestr as
Etanol 95%	3.429 μ l	13,7 ml	27,4 ml	41,1 ml	54,8 ml
Acetato de amonio 7M (PM=77,09 g \Rightarrow 27 g/50ml)	571 μ l	2,3 ml	4,6 ml	6,9 ml	9,2 ml
Volumen final	4 ml	16 ml	32 ml	48 ml	64 ml

7. Agite los tubos para disolver el precipitado antes que forme pellet. Microcentrifugue a 3.000 rpm por 10 minutos.
8. Coloque boca abajo los tubos sobre una toalla de papel para que escurra el líquido. Si el pellet está suelto, agite los tubos otra vez y centrifugue de nuevo.

9. Adicione a cada muestra 1.200 μl de la siguiente mezcla: 40 μl de RNAsa A + 1.200 μl de TE 0,1 mM pH 8,0. Agite hasta resuspender el pellet. LA RNAsa se mantiene en una solución madre de a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ a 5°C.

Reactivo	1 muestra	4 muestras	8 muestras	12 muestr as	16 muestr as
RNAsa A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$	40 μl	160 μl	320 μl	480 μl	640 μl
TE 0,1 mM	1,2 ml	4,8 ml	9,6 ml	14,4 ml	19,2 ml

10. Incube a 37°C por una hora para digerir el ARN.

AQUÍ SE PUEDE DETENER EL PROCESO Y CONTINUARLO DESPUES, COLOCANDO LAS MUESTRAS A 5°C.

11. Centrifugue a 14.000 rpm brevemente para repelletear cualquier residuo sólido no disuelto.

12. Transfiera el supernatante a un tubo limpio y reprecipite el ADN con un volumen similar de isopropanol (-20°C). Mezcle permitiendo que el ADN precipite a temperatura ambiente por al menos 30 minutos.

13. Agite bien para disolver el precipitado antes de que forme pellet. Centrifugue a 3.000 rpm por 5 minutos.

14. Ponga boca abajo los tubos sobre una toalla de papel. Tenga cuidado de no botar los pellets.

15. Haga dos lavados con etanol 70% (aprox. 4 ml por muestra), centrifugando después de cada uno de ellos a 3.000 rpm por 5 minutos. Elimine el alcohol colocando boca abajo los tubos sobre una toalla de papel.

Rehidrate adicionando 1 ml de TE 1M por muestra. Agite golpeando con el dedo el tubo. Guarde en el congelador.

Estime la concentración del ADN.

CALIBRACIÓN DEL MINI-FLUORÓMETRO

1. Mueva las perillas "scale" y "zero" totalmente hacia la izquierda. Encienda el fluorómetro 1 HORA antes de usarse.
2. Gire la perilla "scale" CINCO VECES hacia la derecha. Deje reposar 30 MINUTOS.
3. Lleve la pantalla a cero con la perilla "zero". Deje reposar 10 MINUTOS.
4. Coloque en la cubeta de vidrio 2 ml de solución A. Limpie bien la cubeta externamente con un papel de reloj. Coloque la cubeta en el fluorómetro (siempre la LETRA G hacia el frente).
5. Cierre la tapa de la cámara y ponga la pantalla en cero utilizando la perilla "zero". Determine la estabilidad del cero durante 15 MIN. (+/- 003)
6. Enjuague la cubeta con agua destilada. Agregue 2 ml de la solución A. Ajuste la pantalla nuevamente en cero con la perilla "zero"
7. Saque la cubeta y agregue 2 μ l de una solución estándar a 100 μ g/. Mezcle invirtiendo suavemente la cubeta previamente tapada. Coloque dentro del fluorómetro y ajuste la pantalla a 100 con la perilla "Scale".
8. Repita el procedimiento anterior por lo menos dos veces más para confirmar la precisión de las mediciones.

Una vez que los resultados sean reproducibles, no ajuste la perilla "Scale" de nuevo hasta que todas las mediciones hayan sido hechas. Recuerde poner en cero el fluorómetro luego de cada lectura.

9. Coloque 2 ml de solución A en la cubeta. Añada 2 μ l del ADN que se quiere analizar (previamente agitado con el dedo). Agite suavemente invirtiendo la cubeta. Limpie bien la cubeta por fuera y colóquela en el fluorómetro. La lectura en la pantalla corresponde a la concentración de ADN.

8. Repita el procedimiento anterior por lo menos dos veces más para confirmar la precisión de la medición.

3.1.4.2.2 Calibración con una curva estándar de dilución

Cuando se desea hacer calibración más precisa del fluorómetro, se puede construir una curva estándar de dilución, para lo cual se toman lecturas de soluciones de 2, 4, 6 y 8 μl de la "Solución 1:10 de ADN estándar" (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en 2 ml de la Solución A o B. Con la información generada se construye la curva graficando la concentración "vs" la lectura. Luego se traza la curva de mejor ajuste, la cual permite, previa determinación de la lectura con el fluorómetro, estimar la concentración de una solución determinada. La misma información puede ser obtenida, elaborando la ecuación de regresión lineal.

Soluciones para determinar la concentración de ADN con un Mini-fluorómetro Hoefer TKO 100.

I. "BUFFER" TNE 10X: (1 lt)

12,1 g de Tris base + 3,7 g de EDTA disódico dihidratado + 116,9 g de NaCl

Afore hasta un litro con agua destilada.

Ajuste el pH a 7,4 con HCl concentrado

Filtre (0,45 μ m) antes de usarse

Almacene a 4°C por no más de tres meses.

Este "buffer" es 100 mM de Tris-HCl, 10 mM de EDTA y 2M de NaCl.

II. SOLUCION 1:10 (100 μ g/ml) DE ADN ESTANDARD:

100 μ l de ADN standard (1 mg/ml) + 100 μ l de "buffer" 10X TNE + 800 μ l de agua destilada

Agite fuertemente y almacene a 4°C por no más de tres meses.

III. SOLUCION COLORANTE CONCENTRADA: (10 ml)

10 mg de colorante H 33258 (Hoefer TKO 310) + 10 ml de agua destilada.

No filtre. Almacene a 4°C por no más de seis meses en botellas ámbar o botellas recubiertas con papel aluminio.

IV. SOLUCION DE TRABAJO A: (para concentraciones de 10 a 500 ng/ml)

10 μ l Sol. Colorante Concentrada + 10 ml de "buffer" TNE 10X + 90 ml de agua destilada.

No filtre. Use soluciones del mismo día y a t° ambiente

V. SOLUCION DE TRABAJO B: (para concentraciones de 100 a 2.000 ng/ml)

100 μ l de Sol. Colorante Conc. + 10 ml de "buffer" TNE 10X + 90 ml de agua destilada.

No filtre. Use soluciones del mismo día y a t° ambiente

ELECTROFORESIS EN GEL DE AGAROSA (Philips, W., Rodriguez, H. Fritz, P. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. CATIE. Costa Rica)

PROCEDIMIENTO

- 1. Prepare suficiente "buffer" TBE 0,5X para la cámara de electroforesis y para el gel, según se señala en el Cuadro 1.**

También puede usarse TAE 50X (Cuadro 2), en cuyo caso debe sustituirse en los pasos siguientes este "buffer", por el TBE 0,5X.

- 2. Prepare 100-200 ml de una solución de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X. Caliente hasta que la agarosa se disuelva.**

La cantidad de solución depende de la capacidad de la cámara de electroforesis, ya que una cámara grande requiere 200 ml y una pequeña 100 ml.

La solución debe prepararse en un recipiente en el que su volumen no ocupe más del 50 % de la capacidad del recipiente. La agarosa puede disolverse usando una plantilla y agitando constantemente, o bien, utilizando un horno de microondas, en cuyo caso se debe definir el tiempo necesario para que el proceso se lleve a cabo sin pérdidas significativas de agua, lo que alteraría la concentración (aprox. 2 minutos).

Siempre se debe usar el mismo "buffer" para llenar tanto el tanque de electroforesis como para preparar el gel. Pequeñas diferencias en intensidad iónica o en pH, pueden crear frentes en el gel que pueden afectar significativamente la movilidad de los fragmentos de ADN.

- 3. Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente como para ser sostenida en la mano, vacíela en la cubeta de electroforesis.**

La cubeta ha sido preparada colocando en ambos extremos una cinta adhesiva que evita que el líquido se derrame. Una vez que se ha depositado la solución de agar en la cubeta, se colocan en los espacios respectivos, dos peines que formarán los pequeños hoyos o pozos en los cuales se ubicarán las muestras. Cuando el gel se enfría, se eliminan las cintas y los peines y se coloca la cubeta dentro de la cámara de electroforesis. El grosor del gel debe ser de aproximadamente 3 mm.

- 4. Por cada muestra coloque en sendos tubos Eppendorf los siguientes ingredientes:**

1 μ l ADN + 17 μ l TE + 2 μ l "loading buffer" Bpb = 20 μ l

En el Apéndice 10 y en el Cuadro 3 se indica la forma en que se prepara el TE y el "buffer" Bpb, respectivamente.

5. Prepare el marcador de pesos moleculares (Fago Lambda/Hind III) 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

El marcador se prepara diluyendo la solución madre en TE hasta alcanzar una concentración de 50 μ g/ μ l. Generalmente se prepara 1 ml de solución, el cual se guarda en la refrigeradora (5°C).

6. Agite cada muestra con un vortex y colóquelas en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Ubique estratégicamente el marcador de pesos moleculares.

El orden de las muestras en la electroforesis se debe establecer con anterioridad. Anote esta información para facilitar su posterior identificación.

7. Llene la cámara de electroforesis con aproximadamente 1,5 l de "buffer" TBE 0,5X hasta 0,3 cm por encima del gel.

8. Cierre la cámara de electroforesis, coloque adecuadamente los cables y ponga a funcionar hasta que las bandas muestren un adecuado nivel de avance (aproximadamente 1 h).

Corrobore que los cables del aparato se hayan conectado correctamente, el negro en el cátodo y el rojo en el ánodo. Recuerde que el ADN corre hacia el cátodo.

En algunos casos el bromuro de etidio se agrega directamente en la cámara de electroforesis, pero este es un procedimiento más riesgoso al tener que manipular una mayor cantidad de objetos contaminados con este producto. También se ha señalado que se obtienen bandas más claras en ausencia de colorantes.

9. Al finalizar la electroforesis coloque el gel en una solución de bromuro de etidio durante 30-60 minutos.

La dilución de bromuro de etidio utilizada en la electroforesis se prepara mezclando 25 μ l de una solución concentrada en 500 ml de agua destilada. Esta solución puede usarse varias veces antes de deshecharse, pero aproximadamente, cada cuatro geles que se colorean, deben adicionarse 5 μ l de una solución concentrada de bromuro de etidio.

10. Lave el exceso de solución transfiriendo el gel a una bandeja con agua destilada en donde permanece 15 minutos.
11. Con una lámpara de luz ultravioleta observe el resultado de la electroforesis y obtenga la fotografía del gel.
12. Determine la concentración de ADN comparando la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular con las bandas obtenidas por las muestras. Para esto utilice la escala que se anota en el Cuadro 4.

Cuadro 1 Preparación del "buffer" TBE 0,5 X (Tris Borato EDTA)

PASO 1. Prepare una solución 5X de TBE de acuerdo con las proporciones que se indican a continuación. Para evitar que precipite, almacene en botellas de vidrio a temperatura ambiente, descartando cualquier botella que muestre precipitados.

SOLUCION	VOLUMEN TOTAL	
	0,5 l	1,0 l
EDTA 0,5 M pH=8 *	10 ml	20 ml
TRIS BASE pH=8 *	27 g	54 g
ACIDO BORICO	13,8 g	27,5 g
H ₂ O DESTILADA (aforar hasta)	0,5 l	1,5 l

* Para su preparación vea al final de este anexo.

PASO 2. Prepare 2,5 l de una solución 0,5X agregando 250 ml de TBE 5X en 2.250 ml de agua destilada. Esta solución es 0,045 M en Tris-Borato y 0,001 M en EDTA.

Cuadro 2 Preparación del "buffer" TAE 50 X (Tris Acetato EDTA)

SOLUCION	VOLUMEN TOTAL		
	0,5 l	1,0 l	1,5 l
EDTA 0,5 M pH=8 *	50 ml	100 ml	150 ml
TRIS BASE pH=8 *	121 g	242 g	363 g
ACIDO ACETICO	28,6 ml	57,1 ml	85,7 ml
H ₂ O DESTILADA (afore hasta)	500 ml	1000 ml	1500 ml

* Para su preparación vea al final de éste anexo..

Para preparar un litro de una solución TAE 1X se mezclan 20 ml de la solución anterior (50X) con 980 ml de agua destilada.

Cuadro 3 Preparación del "loading buffer" Bpb

SOLUCION	VOLUMEN
AZUL DE BROMOFENOL (Bpb)	100 µl
GLICEROL	500 µl
EDTA 0,5 M pH=8'al	100 µl
H ₂ O DESTILADA (aforar hasta)	10
ml	

* Para su preparación vea al final de éste anexo.

El "buffer" se guarda en la refrigeradora (5 °C) en alicortas de 1 ml.

Cuadro 4 Características de los fragmentos obtenidos mediante la digestión del fago lambda con la enzima Hind III.

NUMERO DEL FRAGMENTO	CANTIDAD DE PARES BASES	DALTON	% DEL TOTAL.	ng/FRAGM.
1	23,13	15,0x10 ⁶	47,7	238,5
2	9,416	6,12x10 ⁶	19,4	97,0
3	6,557	4,26x10 ⁶	13,5	67,5
4	4,361	2,83x10 ⁶	9,0	45,0
5	2,322	1,51x10 ⁶	4,8	24,0
6	2,027	1,32x10 ⁶	4,2	21,0
7	564	0,37x10 ⁶	1,7	8,5
8	125	0,08x10 ⁶	0,3	1,5

PREPARACION DE LAS SOLUCIONES EDTA, TRIS-HCL Y DEL "BUFFER" TE

Solución EDTA 0.5 M pH 8,0

Para preparar esta solución, adicione 93 g de etilendiaminotetracetato (EDTA) disódico dihidratado (PM=372,2) en un Erlenmeyer de 1 litro y afofe hasta 500ml con agua destilada. Agite la solución vigorosamente con un agitador magnético y ajuste el pH a 8.0 con NaOH (aprox. 10gr de lentejuelas). Se debe recordar que el NaOH al igual que el HCL son productos muy caústicos que deben manipularse en forma cuidadosa y con anteojos protectores. La solución puede conservarse en la refrigeradora (5°C) por periodos relativamente largos (aprox. 6 meses). Antes de volverse a usar es conveniente corroborar el pH de la solución a temperatura ambiente.

Solución TRIS-HCL 1 M pH 8,0

Para su preparación disuelva 121,1 gr de Tris base en 500ml de agua destilada. Afore a un litro y ajuste el pH a 8,0 con HCL concentrado (aprox. 52ml).

El Tris-HCL puede prepararse con anticipación y conservarse en la refrigeradora (5°C) por periodos relativamente largos (aprox. 6 meses).

De acuerdo con Sambrook *et al* (1989) citado por Philips *et al* (1995), para la preparación de ésta solución se debe tener en cuenta los siguientes aspectos:

Si la solución resulta con un color amarillento debe descartarse y conseguirse un Tris de mejor calidad o un recipiente más reciente.

Aunque algunos electrodos no miden con precisión el pH de las soluciones Tris, la mayoría de los fabricantes expeden electrodos con esta capacidad.

El pH de la solución Tris depende de la temperatura, decreciendo aproximadamente en 0,03 unidades por cada grado centígrado en que se incremente la temperatura. Así por ejemplo, una solución 0,5 M tiene un valor de pH de 9,5, 8,9 y 8,6 a 5, 25 y 37 °C, respectivamente.

PREPARACION DEL "BUFFER" TE

SOLUCION FINAL	CONC. 100 ml	VOLUMEN TOTAL		
		150 ml	200 ml	
EDTA 0,5 M	1 mM	0,2 ml	0,3 ml	0,4 ml
TRIS-HCl 1M	10 mM	1,0 ml	1,5 ml	2,0 ml
H ₂ O DESTILADA (aforar hasta)		100 ml	150 ml	200 ml
AJUSTE CON HCl EL pH A 7,2				