

AVANCE EN EL USO DE MARCADORES MOLECULARES EN LA COOPERATIVA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO FORESTAL GENFORES

Fabiana Rojas Parajeles, B.Sc. fabi83@gmail.com. (506) 2550-2313. Apto Postal 159-7050

Olman Murillo Gamboa, Ph.D. Costa Rica. olmuga@yahoo.es. (506) 2550-2511.

Resumen

A inicios de los años 2000, la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (TEC), inició un Programa de Mejoramiento y Conservación Genética Forestal (GENFORES), en un modelo de vinculación Universidad-empresa. Hoy día GENFORES evoluciona en una cooperativa conformada por 8 empresas costarricenses y 4 empresas a nivel internacional en Colombia, Ecuador, Brasil y Nicaragua. Como parte de sus funciones, el TEC desarrolla el soporte científico de la cooperativa, dirige los programas de mejoramiento de sus asociados, capacita y transfiere tecnología. En su laboratorio de genética molecular se han producido aplicaciones con varios tipos de marcadores moleculares en *Tectona grandis*, *Gmelina arborea*, *Vochysia guatemalensis*, *Acacia mangium*, *Dipteryx panamensis*, *Hieronyma alchorneoides*, entre otras especies. Las colecciones clonales en los programas de las empresas frecuentemente registran problemas de etiquetado que deben ser revisados anualmente. Determinación de la huella genética para cada genotipo y estimación del grado de parentesco entre las accesiones dentro de cada población, son ejemplos de parámetros vitales en el manejo de poblaciones de mejoramiento. Se presenta la determinación de la huella genética en una colección de 52 clones de *T. grandis* con el uso de 8 *loci* microsátelites (AC28-AC01-A11-B02-C03-F01-F05-A06). Se muestra la huella genética y agrupamiento de 33 genotipos de *V. guatemalensis* con base en su similitud genética. El mayor polimorfismo se registró en los *loci* A1-20 y A1-15 de cuatro investigados, con un registro de 7 alelos cada uno. La probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar dentro de esta población tengan el mismo genotipo, fue de 8,34% (poder de discriminación de 91,66% basada en dos *loci*). Se discute sobre el desarrollo de otras aplicaciones de los marcadores genéticos en GENFORES, como apoyo al mejoramiento y conservación genética forestal.

Introducción

A inicios del año 2000, la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), inició un Programa de Mejoramiento y Conservación Genética Forestal (GENFORES), en un modelo de vinculación Universidad-empresa. Hoy día GENFORES es una cooperativa conformada por 8 empresas costarricenses y 4 empresas a nivel internacional. Dentro del soporte científico que brinda la cooperativa, se encuentra el desarrollo de aplicaciones con marcadores moleculares en las distintas especies que conforman el programa, las cuales incluyen *Tectona grandis*, *Gmelina arborea*, *Vochysia guatemalensis*, *Acacia mangium*, *Dipteryx panamensis*, *Hieronyma alchorneoides*.

En la mayoría de especies forestales tanto de interés económico, como en aquellas prioritarias para conservación, ha sido clave el avance de la genética

molecular. Los marcadores genéticos, han generado aplicaciones complejas en el campo de la conservación y mejoramiento genético. Esas aplicaciones incluyen la evaluación de la variación genética dentro y entre las poblaciones, determinación del grado de parentesco, verificación de la pureza de los jardines clonales y huertos semilleros, establecimiento de la huella genética para la identificación clonal (Haines 1994), así como posibilidades de selección temprana (Araya *et al.* 2005).

Se presenta en este estudio el avance que se ha logrado con las especies *Vochysia guatemalensis* Donn. Smith (Vochysiaceae, Flores 1993) Debido a su gran capacidad para tolerar suelos ácidos, con mal drenaje y su buen crecimiento, ha experimentado un auge reciente en los programas de reforestación en Costa Rica (Flores 1993, Quirós 2000, Delgado *et al.* 2003, Alice *et al.* 2004).

Tectona grandis (Verbenaceae), teca, como se le conoce comúnmente, fue introducida en América Latina a inicios del siglo pasado, pero su auge ha ocurrido en los últimos 25 años.

Materiales y Métodos

Material genético utilizado

Las muestras de *Vochysia guatemalensis* pertenecen a la colección clonal (62 genotipos) del programa de conservación y mejoramiento genético que desarrolla la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR). El primer número en la codificación corresponde al árbol madre y el segundo número a la progenie dentro de cada familia. Los 52 genotipos de *T. grandis*, forman una colección completa de una de las empresas miembro de GENFORES.

Extracción de ácidos nucleicos totales (ANT)

La extracción de ANT se realizó siguiendo la metodología descrita por Lodhi *et al.* (1994), con las modificaciones y optimizaciones realizadas por Rojas *et al.* (2007) para *V. guatemalensis* y de Albertazzi y Villalobos, 2000 para *T. grandis*.

Validación de la amplificación

Se ha validado tres loci en teca, utilizando la mezcla de PCR y el perfil térmico reportado por Verhaegen *et al.* 2005, con algunas modificaciones. La estrategia utilizada ha sido tomar dos rametos (brotes terminales) de diez clones distintos, para un total de 20 muestras. En el caso de *V. guatemalensis*, la validación se efectuó de la misma manera, utilizando la mezcla de PCR y el perfil térmico reportados por Lowe *et al.* 2002 con modificaciones realizadas por Rojas *et al.* 2007.

Frecuencias alélicas y polimorfismo

Se utilizaron ocho loci microsatélites para *T. grandis* y dos para *V. guatemalensis* de cuatro utilizados inicialmente. Una vez establecido el genotipo de cada clon, se determinó la huella genética y las frecuencias alélicas. El Contenido de Información Polimórfica (CIP) se obtuvo de la relación:

$$CIP_j = 1 - (\sum p_i^2),$$

p_i = frecuencia i de cada uno de los alelos registrados en el locus j .

En *V. guatemalensis* los valores de diversidad genética se calcularon según Gregorius (1978):

$$v_j = (\sum p_i^2)^{-1},$$

p_i = frecuencia de cada uno de los alelos i en el locus j .

Con base en el genotipo de 33 clones de *V. guatemalensis* se procedió a determinar la distancia genética entre clones, con base en el principio de la comparación y determinación del número de alelos que comparten en cada locus, desarrollada por Gregorius (1978). La distancia genética fue calculada con el valor de similitud:

Distancia Genética = 1- Similitud.

$$\text{Similitud} = \frac{1 \text{ Número de alelos comunes}}{j \quad 2},$$

j = número de loci.

En *V. guatemalensis* se determinó la distancia genética entre cada clon individual en relación con el colectivo de todos los restantes 32 clones (Gregorius (1974). De la población de 33 clones se eliminó uno cada vez y se obtuvo las frecuencias alélicas de la subpoblación restante (submuestra de 32 clones). Se obtuvo entonces la distancia genética entre el clon individual y la subpoblación restante. De esta manera se continuó con todos los demás 32 clones:

$$D = \frac{1}{2} * \sum |p_i - p_i'|;$$

p_i = frecuencia del alelo i en el clon j extraído de la población;

p_i' = frecuencia del alelo i en la subpoblación restante de 32 clones.

Probabilidad de ocurrencia y apareo

La probabilidad de ocurrencia de cada uno de los 49 posibles genotipos de *V. guatemalensis* para cada locus, se calculó multiplicando la frecuencia de cada alelo respectivo. Al multiplicar los valores más altos de frecuencias alélicas en cada locus, se obtiene la probabilidad del genotipo más frecuente al usar ambos loci. Con los datos de probabilidad de ocurrencia se calcula la probabilidad de apareo (sumatoria al cuadrado de cada una de las frecuencias) y ese dato es utilizado para estimar el poder de discriminación (1-probabilidad de apareo) (Morales 1999).

Agrupamiento genético de la colección de clones

Con el programa TREECON versión 1.3b (Van de Peer y De Wachter 1994) se generó el agrupamiento de los clones de *V. guatemalensis* con base en la estimación de distancia genética establecida por Nei y Li (1979). Se utilizó una matriz de presencia/ausencia de alelos. Se realizó un análisis UPGMA (Unweighted Pair-Group Method of Arithmetic Averages) al que se le aplicó un análisis de reemplazo "bootstrap". Con Statistical Release 6, se realizó un análisis

multivariado de ordenación, denominado “multidimensional scaling” (MDS), con base en la matriz de distancia genética. Este análisis permite explicar similitudes-disimilitudes (distancias) observadas entre los elementos investigados, agrupándolos de acuerdo a la proporción de la variación.

Resultados y discusión

En ambas especies, la extracción de ANT fue de buena calidad. Se observaron bandas de ADN definidas y de alto peso molecular. Para el caso de *V. guatemalensis* (figura 1) la presencia de ARN fue menor que en *T. grandis*, en la cual a pesar de dos tratamientos con ARNasa, se mantuvo la presencia de ARN (figura 2).

En *V. guatemalensis*, de cuatro loci analizados el mayor polimorfismo se registró en A1-20 y A1-15, con siete alelos cada uno. Para los loci A1-5 y A1-35 se detectaron cinco y seis alelos, respectivamente (Cuadro 1).

Con base en el número total de alelos de cada locus se puede determinar que los loci analizados son altamente polimórficos. Se obtuvo para *V. guatemalensis* entre cinco y siete alelos y para *T. grandis*, un rango entre 2 y 10 alelos.

Para *V. guatemalensis*, las frecuencias alélicas (Cuadro 2), se calcularon solamente para los loci A1-20 y A1-15, debido a problemas de amplificación con algunas muestras en los otros dos loci. En el locus A1-15 se registraron tres alelos con frecuencias de un 3% y un solo alelo predomina con un 45% de las frecuencias alélicas totales.

El CIP es un valor comúnmente usado para medir el grado de información de un marcador genético en una población, de acuerdo a la frecuencia de los alelos observados. También es utilizado en estudios de ligamiento y no depende del modo de herencia del rasgo en estudio (Guo y Lestón 1999). El CIP promedio encontrado para los loci de *V. guatemalensis* fue de 0,77.

Con respecto a la determinación de la huella genética, esta se logró para 33 clones de *V. guatemalensis* (Cuadro 3) y para 50 clones de *T. grandis* (Cuadro 4). Los clones 19-4 y 39-1, 101-8-200-2, el grupo de clones 19-1, 19-6, 19-7 y el clon 104-1 en *V. guatemalensis*, aparecen con el mismo genotipo. El resto de los clones registraron genotipos diferentes.

Cada sombreado representa el grupo de clones que registraron el mismo genotipo. Debido a que varios de los clones son medios hermanos entre sí y al bajo número de familias evaluadas en *V. guatemalensis*, podría argumentarse que las frecuencias alélicas del cuadro 2 podrían estar sesgadas. En los cuadros 5 y 6, se muestra para cada locus evaluado en *V. guatemalensis* las probabilidades de ocurrencia de cada genotipo. De tal modo que la probabilidad de ocurrencia del genotipo $A_3A_3C_1C_3$ es de 0,0047 (clones 19-1, 19-6, 19-7 y 104-1), la del genotipo $A_4A_4C_4C_5$ es de 0,0004 (clones 19-4 y 39-1) y para el genotipo $A_6A_6C_1C_5$ de 0,0020 (clones 101-8 y 200-2).

Los genotipos de mayor probabilidad de ocurrencia en cada locus (A_3A_3 y C_1C_1 ; $p= 0,0529$ y $0,2025$ respectivamente), son aquellos con la combinación de los alelos con mayor frecuencia en sus respectivos locus. Asimismo, la probabilidad de ocurrencia para el genotipo más probable al combinar los dos loci ($A_3A_3C_1C_1$) es de 0,0107.

Diversidad y distancia genética

El valor de diversidad genética obtenido para el locus A (imprimador A1-20) fue de 5,89 y para el locus C (imprimador A1-15) de 3,55. El valor de diversidad promedio para los dos loci fue de 4,72. En el Cuadro 7 se muestra la matriz de las distancias genéticas entre los 33 clones de *V. guatemalensis* con base en los loci A1-20 y A1-15.

Agrupamiento genético de la colección de clones

El Cuadro 8 muestra qué tan distante genéticamente es cada uno de los clones de *V. guatemalensis* con respecto a la población total. El valor medio de distancia entre clones fue 68%, lo cual indica que en promedio, los clones comparten un 32% de su material genético con el resto de la población. Cuatro clones (19-4, 39-1, 102-5 y 103-2) registraron una distancia genética mayor al 80% con respecto al resto del grupo.

El análisis de agrupamiento (dendrograma), en el cual se aprecia la formación de tres subgrupos (figura 3). Las mayores similitudes se presentan para los clones 41-4, 101-3, 120-8, 103-4, 120-3, 19-8, 101-6, 120-1, 101-8, 200-2, 120-5, 104-5, 120-4, 103-1, 101-1, 36-1 y 101-4. En la figura 4 esos mismos clones son ordenados de forma muy cercana.

En el segundo subgrupo del dendrograma se ubican los clones 119-1, 39-2, 119-2, 30-1, 200-4, 19-1, 19-6, 19-7, 104-1, los cuales se observan en el análisis de ordenación cercanos a los clones del subgrupo 1, a excepción del clon 119-1, el cual se ubica más distante. En el análisis de agrupamiento los clones 103-2, 101-2, 41-2, 104-2, 102-5, 19-4 y 39-1 son agrupados en un tercer subgrupo, mientras que en el análisis de ordenación aunque se mantienen como los clones con mayores distancias, se separan y se ordenan los clones 41-2 con el 104-2 y el 102-5 con los clones 19-4 y 39-1.

En la figura 3 la agrupación específica de los clones 101-8 con 200-2; 19-1, 19-6, 19-7 con 104-1 y 19-4 con 39-1, muestran un 100% de similitud y valores de reemplazo de 30%, 20% y 100% respectivamente.

Bibliografía

- Alice, F., F. Montagnini & M. Montero. 2004. Productividad en plantaciones puras y mixtas de especies forestales nativas en la estación biológica La Selva, Sarapiquí, Costa Rica. Agron. Costarric. 28: 61-71.
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005. Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal. En: Seminario-Taller: Avances en Silvicultura Clonal, 26-29 Julio, 2005. San José, Costa Rica. 15 p.
- Delgado, A., M. Montero, O. Murillo & M. Castillo. 2003. Crecimiento de especies forestales nativas en la zona norte de Costa Rica. Agron. Costarric. 27: 63-78.
- Doyle, J. y Doyle J.L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. Phytochemical Bulletin 19: 11-15.

- Flores, E. 1993. *Vochysia guatemalensis*, *Vochysia ferruginea* y *Hyeronima alchorneoides*. Árboles y Semillas del Neotrópico 2: 1-28.
- Flores-Vindas, E & G. Obando-Vargas. 2003. Árboles del trópico húmedo, Importancia socioeconómica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. p 827-833.
- Gregorius, H.R. 1974. Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genet.* 23: 22-27.
- Gregorius, H.R. 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biociencias* 41:253-271.
- Guo, X; Lestón, R. 1999. Linkage Information Content of Polymorphic Genetic Markers. *Hum Hered* 49:112–118.
- Haines, R. 1994. La biotecnología en el mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. *Unasyuva* 45:46-52.
- Keogh, R.M. 1987. The care and management of Teak (*Tectona grandis* L.f.) plantations. A practical field guide for foresters in the Caribbean, Central America, Venezuela and Colombia. du Quesne Ltd. Gorta, Irlanda. 48 p.
- Kertadikara, A.W.S.; Prat, D. 1995. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. *Theoretical and Applied Genetics* 90: 803-810.
- Lodhi, M; Ye, G; Weeden, N; Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis* species. *Plant Molecular Biology Reporter* 12:6-13.
- Lowe, A; Goodall-Copestake, W; Caron, H; Kremer, A; Decroocq, S. 2002. A set of polymorphic microsatellites for *Vochysia ferruginea*, a promising tree for land reclamation in the Neotropics. *Molecular Ecology Notes* 2:153-155.
- Morales A.I. 1999. Pruebas de marcadores genéticos. Laboratorio de criminalística. Fascículo 3. Editorial EUNED. San José, Costa Rica. p. 19-20.
- Nei, M & W-H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 5269-5273.
- Quirós, M. 2000. Evaluación de la calidad de las plantaciones forestales del Proyecto de Especies Nativas de la Región Huetar Norte. B. Sc. tesis, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, Costa Rica.
- Rojas, F., O. Murillo, E. Araya, G. Aguilar & O. Rocha. 2007. Validación y adaptación de la técnica de microsatélites para el análisis genético de *Vochysia guatemalensis* Donn. *Sm. For.Ver* 9: 9-15.
- Van de Peer, Y., Y. De Wachter. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees for the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* 10: 569-70.

Verhaegen, D; Ofori, D; Fofana, I; Poitel, M; Vaillant, A. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes* 5: 945-947.

Cuadro 1. Tamaño de alelos (pares de base) para 4 SSR evaluados en una población de clones de *V. guatemalensis*.

Locus	Tamaño de cada alelo (pares de bases)							Promedio
	1	2	3	4	5	6	7	
A1-20 (A)	140	144	149	155	160	175	178	157
A1-5 (B)	131	135	139	147	152	-	-	140
A1-15 (C)	97	102	110	116	119	122	124	112
A1-35 (D)	160	169	172	175	178	184	-	173

Cuadro 2. Frecuencias alélicas para los loci A1-20 y A1-15 con 33 clones de *Vochysia guatemalensis*.

Alelo	Frecuencias Alélicas	
	Locus A (Imprimador A1-20)	Locus C (Imprimador A1-15)
1	0,05	0,45
2	0,18	0,03
3	0,23	0,20
4	0,17	0,12
5	0,06	0,14
6	0,18	0,03
7	0,14	0,03

Cuadro 3. Huella genética de 33 clones de *V. guatemalensis* con dos loci microsatélites.

Clon	Locus A1-20	Locus A1-15		
19-1	A3	A3	C1	C3
19-2	A4	A4	C4	C6
19-6	A3	A3	C1	C3
19-7	A3	A3	C1	C3
19-8	A4	A4	C1	C3
30-1	A1	A3	C1	C2
36-1	A2	A2	C1	C7
39-1	A3	A3	C1	C5
39-2	A3	A3	C1	C5
41-2	A2	A4	C4	C7
41-4	A7	A7	C1	C1
101-1	A2	A2	C1	C5
101-2	A2	A2	C3	C4
101-3	A7	A7	C1	C5
101-4	A2	A2	C1	C1
101-6	A4	A5	C1	C5
101-8	A6	A6	C1	C5
102-5	A4	A4	C4	C4
103-1	A2	A2	C1	C3
103-2	A6	A6	C2	C3
103-4	A7	A7	C1	C3
104-1	A3	A3	C1	C3
104-2	A2	A4	C4	C4
104-5	A6	A6	C1	C6
119-1	A1	A3	C3	C3
119-2	A1	A3	C1	C5
120-1	A5	A5	C1	C1
120-3	A7	A5	C1	C3
120-4	A6	A6	C1	C1
120-5	A6	A6	C1	C3
120-8	A7	A7	C1	C6
200-2	A6	A6	C1	C5
200-4	A3	A3	C1	C1

Cuadro 4. Huella genética (según tamaño de alelos en pb) de 50 clones de la colección clonal de una de las empresas miembro de GENFORES con 8 loci microsatélites.

Clon	Locus A06		Locus B02		Locus C03		Locus F05		Locus F01		Locus A11		Locus AC28		Locus AC01	
1	191	191	221	221	313	313	256	256	222	243	269	269	220	220	248	248
2	-	-	221	221	268	313	256	256	240	240	279	279	198	220	248	248
4	191	191	221	221	263	313	256	256	-	-	279	279	198	220	248	248
6	191	191	-	-	268	313	256	280	222	222	269	269	220	220	248	248
8	191	191	208	221	268	268	256	280	222	222	275	275	210	210	248	248
9	191	191	221	221	268	313	238	256	222	222	279	279	198	220	213	248
10	191	191	221	221	-		238	256	233	233	262	275	198	220	213	248
11	180	197	221	221	268	313	238	256	222	222	-	-	198	220	248	248
12	-	-	-	-	268	268	238	256	222	222	275	275	220	220	248	248
13	191	191	221	221	268	268	238	256	233	233	283	283	198	220	213	248
14	178	191	221	221	-	-	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
16	191	191	-	-	-	-	238	256	222	222	-	-	220	220	248	248
17	191	191	221	221	268	313	238	256	222	222	275	275	220	220	248	248
18	-	-	213	213	278	278	238	256	222	222	275	275	198	220	213	248
20	191	191	-	-	256	292	238	256	233	233	275	275	198	220	213	248
21	178	191	221	246	256	313	256	280	222	222	279	279	220	220	248	248
22	191	191	221	221	268	268	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
23	186	186	221	252	268	268	256	280	233	233	275	275	220	220	248	248
24	178	191	-	-	268	268	256	280	222	222	269	269	220	220	248	248
25	191	191	221	221	275	275	238	256	222	222	283	283	220	220	248	248
26	191	191	221	221	268	268	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
27	191	191	221	221	268	268	238	256	222	222	262	262	220	220	248	248
28	191	191	260	260	256	268	238	256	222	222	269	269	210	220	248	248
30	191	191	221	249	266	313	238	238	233	233	-	-	198	220	213	248
31	191	191	221	221	268	313	256	280	222	222	269	269	198	210	246	248

Clon	Locus A06		Locus B02		Locus C03		Locus F05		Locus F01		Locus A11		Locus AC28		Locus AC01	
32	191	191	221	221	268	268	238	256	222	222	262	269	198	220	213	248
33	191	191	260	260	268	268	256	280	222	222	279	279	210	220	248	248
35	178	191	221	221	275	313	256	280	222	222	269	275	198	220	248	248
36	191	191	221	221	275	313	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
37	191	191	208	208	268	313	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
38	191	191	-	-	268	268	238	256	222	222	269	269	198	220	248	248
39	191	191	221	249	275	313	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
40	191	191	221	221	275	313	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
41	191	191	221	221	268	268	256	280	222	222	283	283	220	220	248	248
42	191	191	221	221	256	268	256	280	222	233	258	279	220	220	248	248
43	191	191	221	221	275	313	238	256	222	222	258	258	220	220	248	248
44	191	191	221	221	268	268	238	256	222	222	269	269	220	220	248	248
45	191	191	221	252	263	263	256	280	222	222	269	269	220	220	248	248
46	174	186	262	262	268	268	256	280	222	222	269	269	198	220	248	248
47	178	191	208	255	275	313	-	-	222	222	269	269	198	220	248	248
48																
49	191	191	221	249	268	268	256	280	222	222	269	269	220	220	248	248
50	191	191	221	221	259	259	238	238	222	222	275	275	220	220	248	248
51	191	191	221	221	268	268	238	256	222	233	258	258	220	220	248	248
53	178	191	221	221	263	313	256	276	222	222	269	269	198	220	248	248
57																
58	191	191	221	249	275	313	238	256	222	222	275	275	198	220	248	248
61	191	191	221	264	223	245	256	280	222	233	262	262	198	220	248	248
62	191	191	221	221	256	256	222	222	222	222	258	258	198	220	248	248
64	191	191	221	246	223	223	256	256	222	222	269	269	220	220	248	248
66	191	191	221	252	268	268	-	-	222	233	269	269	220	220	248	248
67	191	191	221	221	245	245	256	280	212	212	269	269	198	220	248	248

Cuadro 5. Probabilidad de ocurrencia en la población de cada uno de los 49 posibles genotipos para el locus A (A1-20) en *V. guatemalensis*.

		1	2	3	4	5	6	7
		0,05	0,18	0,23	0,17	0,06	0,18	0,14
1	0,05	0,0025	0,0090	0,0115	0,0085	0,0030	0,0090	0,0070
2	0,18	0,0090	0,0324	0,0414	0,0306	0,0108	0,0324	0,0252
3	0,23	0,0115	0,0414	0,0529	0,0391	0,0138	0,0414	0,0322
4	0,17	0,0085	0,0306	0,0391	0,0289	0,0102	0,0306	0,0238
5	0,06	0,0030	0,0108	0,0138	0,0102	0,0036	0,0108	0,0084
6	0,18	0,0090	0,0324	0,0414	0,0306	0,0108	0,0324	0,0252
7	0,14	0,0070	0,0252	0,0322	0,0238	0,0084	0,0252	0,0196

Cuadro 6. Probabilidad de ocurrencia en la población de cada uno de los 49 posibles genotipos para el locus C (A1-15) en *V. guatemalensis*.

		1	2	3	4	5	6	7
		0,45	0,03	0,2	0,12	0,14	0,03	0,03
1	0,45	0,2025	0,0135	0,0900	0,0540	0,0630	0,0135	0,0135
2	0,03	0,0135	0,0009	0,0060	0,0036	0,0042	0,0009	0,0009
3	0,2	0,0900	0,0060	0,0400	0,0240	0,0280	0,0060	0,0060
4	0,12	0,0540	0,0036	0,0240	0,0144	0,0168	0,0036	0,0036
5	0,14	0,0630	0,0042	0,0280	0,0168	0,0196	0,0042	0,0042
6	0,03	0,0135	0,0009	0,0060	0,0036	0,0042	0,0009	0,0009
7	0,03	0,0135	0,0009	0,0060	0,0036	0,0042	0,0009	0,0009

Cuadro 8. Distancia genética de cada clon de *V. guatemalensis* con respecto al resto de clones de la población evaluada.

Clon	Distancia
19-1	0,58
19-4	0,81
19-6	0,58
19-7	0,58
19-8	0,61
30-1	0,64
36-1	0,69
39-1	0,81
39-2	0,61
41-2	0,77
41-4	0,73
101-1	0,63
101-2	0,77
101-3	0,66
101-4	0,70
101-6	0,61
101-8	0,63
102-5	0,88
103-1	0,60
103-2	0,82
103-4	0,63
104-1	0,58
104-2	0,79
104-5	0,69
119-1	0,79
119-2	0,59
120-1	0,77
120-3	0,59
120-4	0,70
120-5	0,60
120-8	0,71
200-2	0,63
200-4	0,68
Promedio	0,68

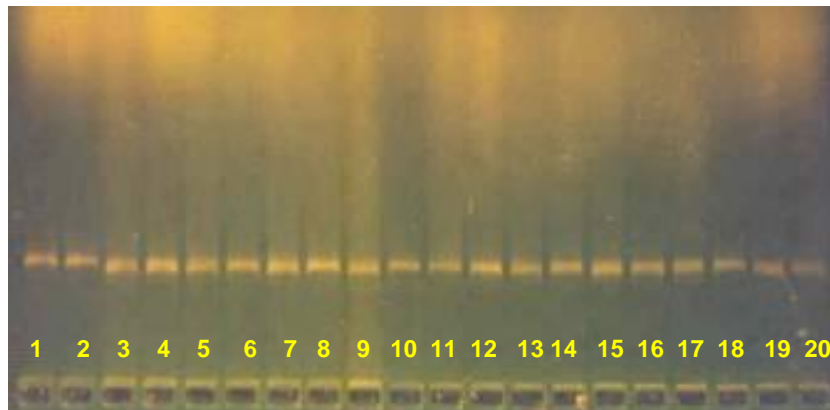


Figura 1. Ácidos nucleicos totales para 20 muestras de *V. guatemalensis*. Gel de agarosa al 1%.

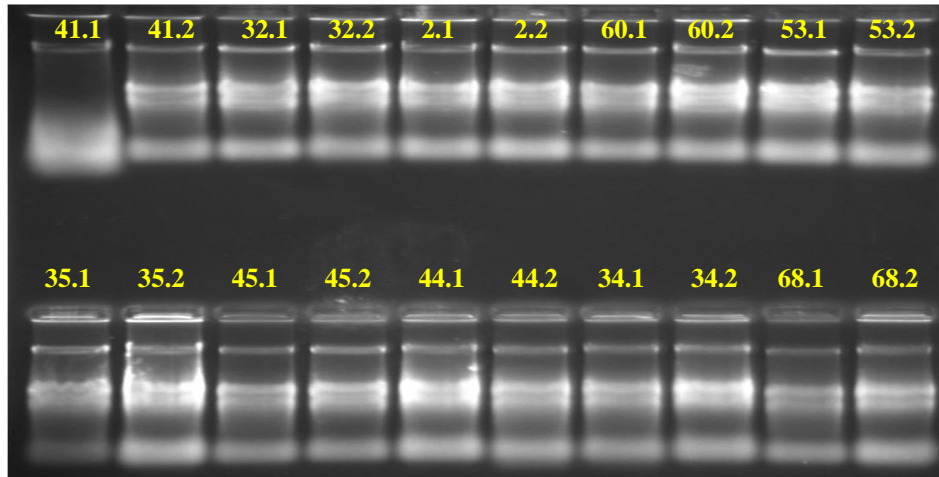


Figura 2. Ácidos nucleicos totales para 10 clones de la colección clonal perteneciente a la Escuela de Ingeniería Forestal, ITCR. Gel de agarosa al 0,8%.

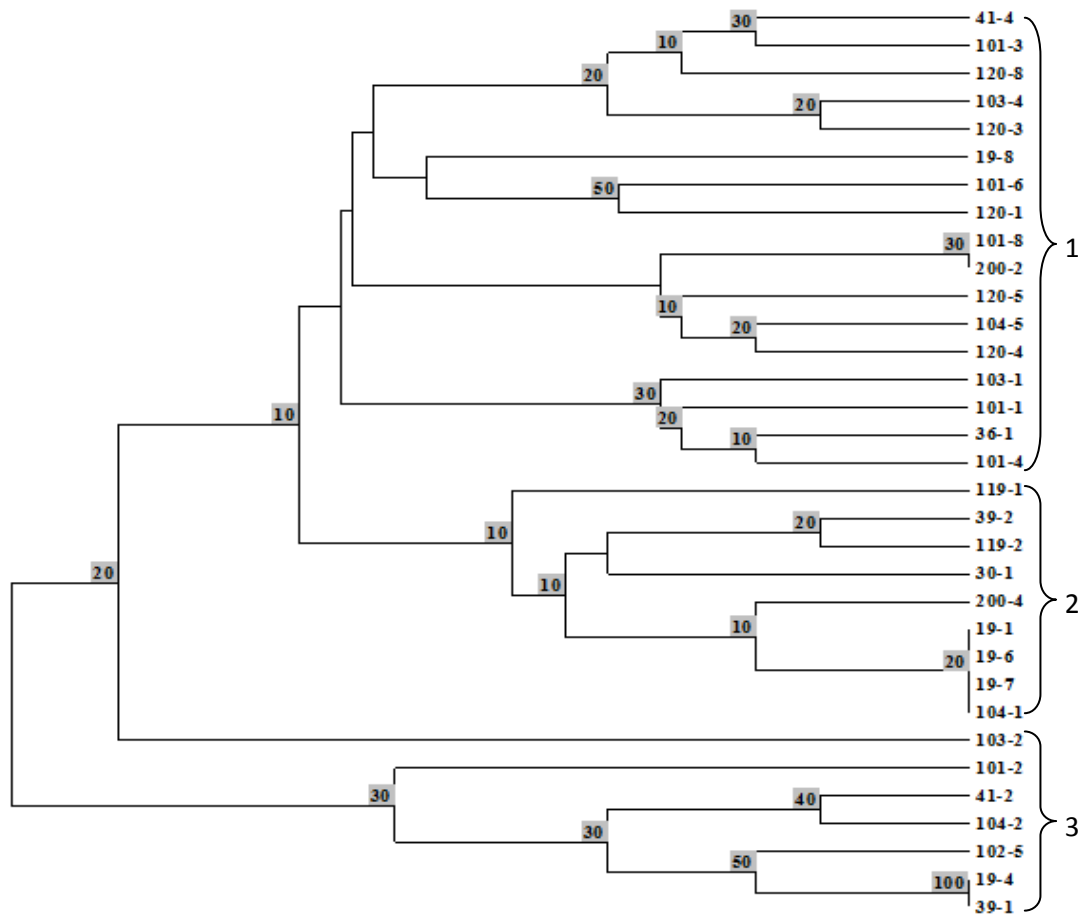


Figura 3. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de 33 clones de *V. guatemalensis* con los loci A1-20 y A1-15.

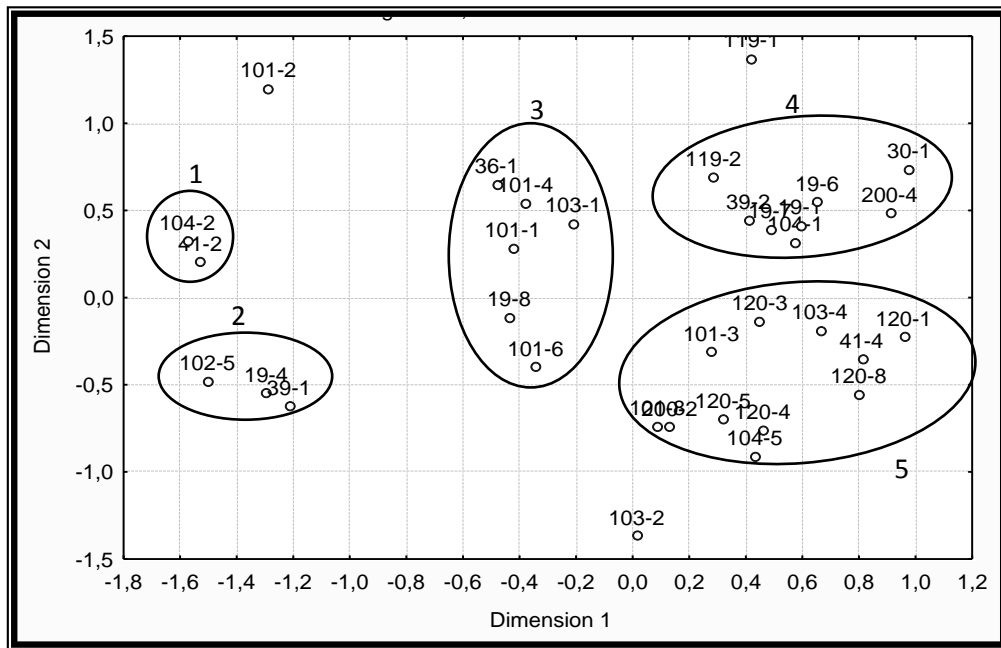


Figura 4. Análisis de ordenación “Multidimensional scaling” de 33 clones de *Vochysia guatemalensis* con los loci A1-20 y A1-15.