

Análisis genotípico en *Vochysia guatemalensis*

Donn Smith (Vochysiaceae)

mediante microsatélites

Fabiana Rojas¹
Olman Murillo¹
Gabriel Aguilar²
Oscar Rocha³
Emanuel Araya⁴

Resumen

En el presente estudio se muestran los resultados del análisis de una colección de 62 clones de *Vochysia guatemalensis* ubicados en la zona norte y caribe de Costa Rica mediante el uso microsatélites (SSR), adaptados y validados de un grupo de marcadores existentes para *Vochysia ferruginea*. El material fue seleccionado de árboles plus procedente de varias poblaciones naturales y de pequeñas plantaciones. Se trabajó en el establecimiento de la huella genética de cada clon y en el agrupamiento de los genotipos con base en su similitud genética. De los cuatro loci analizados, el mayor polimorfismo se registró en los loci A1-20 y A1-15. Para los loci A1-5 y A1-35 se detectaron cinco y seis alelos, respectivamente. El Contenido de Información Polimórfica (CIP) promedio fue de 0,77. La probabilidad de que dos individuos seleccionados al azar en una población de *V. guatemalensis* tengan el mismo genotipo, con base en los loci A y C, fue de 8,34%; es decir, ambos loci tienen una probabilidad de discriminación de 91,66%. La probabilidad de ocurrencia para el genotipo $A_3A_3C_1C_1$ (más probable) del total de genotipos registrados fue de 1,07%; mientras que para los grupos de clones que registraron el mismo genotipo $A_3A_3C_1C_3$ (familia 19) mostraron la mayor probabilidad de ocurrencia (0,47%). La determinación de la huella genética se realizó en 33 clones de la colección total y fue obtenida con base en la utilización de los loci A1-20 y A1-15. El valor de diversidad genética promedio fue de 4,72. El valor medio de distancia genética de cada clon con respecto al resto de clones fue de un 68%. Dos pares de imprimadores de los cinco desarrollados para *V. ferruginea*, suministraron información valiosa para distinguir y determinar la huella genética de 33 genotipos de *V. guatemalensis*, la cual puede ser utilizada para procesos de certificación genética, así como asistencia en programas de conservación y mejoramiento genético.

Palabras claves: *Vochysia guatemalensis*, marcadores genéticos, microsatélites, huella genética, diversidad genética, Costa Rica.

Abstract

Genotypic analysis in *Vochysia guatemalensis* (Vochysiaceae) by means of microsatellites.

In this investigation, a clonal collection of 33 genotypes of *Vochysia guatemalensis* was analyzed utilizing microsatellites (SSR). Gene markers were obtained, adapted and validated, from a group of existing microsatellites for *V. ferruginea*. Fingerprinting analysis was performed in 33 clones, based on loci A1-20 and A1-15. Genotypes were also grouped based on their genetic distance. Among the four analyzed loci, the greater polymorphism was registered in loci A1-20 and A1-15, with seven alleles each one. In loci A1-5 and A1-35, five and six alleles were detected respectively. Polymorphic Information Quantity (PIQ) average was 0.77.

Besides, the probability of finding two individuals random select in *V. guatemalensis* population with the same genotype (for A and C loci) were 8.34%; in other words, both loci have a 91.66% discrimination probability. Furthermore, occurrence probability for the more probable genotype ($A_3A_3C_1C_1$) of the total registered genotypes with two loci were 1.07%. For the clones groups with identical genotype, the 19 family with the $A_3A_3C_1C_3$ genotype showed an occurrence probability of 0.47%. Genetic diversity average was 4.72. Mean genetic distance among all genotypes in relation to the whole population

¹ Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 159-7050 Cartago, Costa Rica; olmuga@yahoo.es, fabi83@gmail.com

² Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica, 2060 San Pedro de Montes de Oca, San José, Costa Rica; gabriel1@costaricense.cr

³ Kent State University, Ohio, USA; orocha@kent.edu

⁴ ASD Costa Rica. e.araya@asd-cr.com

was 68%. Two pairs of primers, out of five developed for *V. ferruginea*, gave useful information in *V. guatemalensis* to distinguish and assess the fingerprinting in 33 genotypes. Therefore, loci A1-20 and A1-15 are highly polymorphic in this *V. guatemalensis* collection, and may be useful in genetic certification processes, as well as in assisting gene conservation and breeding programs.

Key words: *Vochysia guatemalensis*, Gene markers, Microsatellites, Fingerprinting, Genetic diversity, Costa Rica.

Introducción

Vochysia guatemalensis Donn. Smith (Vochysiaceae) es nativa de Costa Rica y su distribución natural se extiende en Sudamérica hasta Brasil y hacia el norte hasta Guatemala y sur de México (Flores y Obando 2003). Es una especie característica del bosque tropical húmedo y muy húmedo de las planicies costeras bajas. Generalmente esta especie se ha asociado a bosques secundarios y sitios de colonización; sin embargo, en Costa Rica se encuentra también en bosques primarios (Flores y Obando 2003).

Su madera tiene poca durabilidad natural, por lo tanto se le utiliza en la construcción de cajas, formaletas y contrachapado. Su principal potencial se encuentra en la producción de pulpa para papel, inclusive supera a *Gmelina arborea* debido a la calidad de sus fibras (Flores y Obando 2003). Debido a su gran capacidad para tolerar suelos ácidos, con mal drenaje, además de 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). Su potencial para la producción de madera y grandes cantidades de biomasa ha motivado el desarrollo de programas de conservación y mejoramiento genético con esta especie (Mesén y Trejos 1997; Badilla, *et al.* 2000). Recientemente, se ha incursionado en el desarrollo y adaptación de la técnica de microsatélites con la especie *V. guatemalensis* para apoyar los programas de conservación y mejoramiento genético existentes en el país (Rojas 2006, Rojas *et al.* 2007). Dentro de los marcadores genéticos se encuentran los basados en ADN, donde se ubican los microsatélites o SSR (Simple Sequences Repeated). Son secuencias simples repetidas que se caracterizan por ser altamente polimórficas, considerablemente informativas, dado el alto número de alelos y la posibilidad de poder reconocer los genotipos codominantes o heterocigotos. Tienen además alto poder de discriminación, el número de fragmentos obtenidos por locus es mayor con respecto a otros marcadores, la transferencia de fragmentos se da incluso dentro de subgéneros y la reproducibilidad es muy alta (Glaubitz y Moran 2000).

El uso de marcadores genéticos en especies forestales ha adquirido relevancia en los últimos años, debido a la gran cantidad de aplicaciones que se han logrado desarrollar para su utilización en programas de conservación y mejoramiento genético forestal (Finkeldey y Murillo 1999, Murillo y Rocha 1999, Murillo y Finkeldey 2000, Araya *et al.* 2005a, Araya *et al.* 2005b). Dentro de esas aplicaciones destacan la determinación de la huella genética de cada genotipo y protección de la propiedad intelectual (Fossati *et al.* 2005), determinación del nivel de parentesco en colecciones de conservación *ex situ* (Murillo y Finkeldey 2000), medición de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones (Finkeldey y Murillo 1999), análisis del grado de aislamiento (Murillo y Rocha 1999), efecto de la fragmentación en las poblaciones naturales (Murillo 1997), tasa de mutagénesis, elección de poblaciones con fines de conservación genética (Murillo 2005), entre otros temas relevantes. En programas de mejoramiento genético con especies forestales, los marcadores genéticos han sido utilizados en la verificación de la pureza de los jardines clonales y de los ensayos genéticos en campo, en la determinación de la huella genética para cada genotipo, posibilidades de selección temprana, determinación de la similitud genética y análisis de parentesco dentro de la población de mejoramiento (Araya *et al.* 2005a).

Los objetivos de este estudio consistieron en establecer la huella genética y determinar el grado de parentesco genético en una colección de clones de *Vochysia guatemalensis*, a partir de microsatélites (SSR) generados para *Vochysia ferruginea* (Lowe *et al.* 2002). En esta investigación se presentan los resultados de la utilización del análisis de conglomerados o dendrograma UPGMA y el análisis de ordenación "Multidimensional Scaling" (MDS), como técnicas para agrupar genotipos con base en su similitud genética.

Materiales y métodos

Material genético utilizado

Se trabajó con una colección de 62 clones del programa de conservación y mejoramiento genético, que desarrollan la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y la Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central de Costa Rica (FUNDECOR) en la zona norte y caribe del país. La colección se obtuvo a partir de la selección de árboles plus procedentes de varias poblaciones naturales y de pequeñas plantaciones de *Vochysia guatemalensis* de la zona norte y sur del país (Quirós 2000). De cada árbol plus se colectó la semilla (progenie), se eligieron las diez plántulas de mayor vigor en el vivero, basado en el crecimiento inicial y ausencia de enfermedades o torceduras de tallo. Cada plántula se identificó con un código compuesto por dos números, el primer número para el árbol madre y un segundo número para el clon dentro de cada árbol madre. Las plántulas elegidas se multiplicaron vegetativamente a partir del enraizamiento

de miniestacas uninodales tomadas del meristemo principal. Las miniestacas se enraizaron en minitúneles dentro del invernadero de producción clonal forestal del ITCR en Santa Clara de San Carlos, tal y como detallan Murillo *et al.* (2003). Se establecieron colecciones de cada uno de estos clones en pequeños lotes, los cuales se han mantenido en constante reproducción e investigación desde el año 2000 (Murillo *et al.* 2003).

La colección genética se localiza en la sede regional del ITCR en Santa Clara de San Carlos (N10°21'29,61" y N10°22'02,18"), a una altitud de 70 m.s.n.m.; bajo una precipitación de 3 500 mm/año con un período seco (< 50 mm/mes) en febrero y marzo; temperaturas promedio que oscilan entre 27 a 31 oC. Las plantas están sembradas en tierra a 40 x 40 cm de distancia, que conforman las colecciones clonales de este programa. Se estableció también una réplica completa de toda la colección clonal, en potes plásticos de un volumen de 3 780 centímetros cúbicos. De cada uno de estos lotes clonales se eligió una planta al azar y se le colectó dos pares de hojas tiernas (brotes terminales). La muestra fue debidamente etiquetada y empacada en bolsas plásticas herméticas, para su posterior traslado al laboratorio de Ecología-Genética de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica en San José, donde fueron almacenadas a -20 oC hasta su respectivo análisis.

Procesamiento de las muestras en laboratorio

Cada muestra fue debidamente rotulada antes de iniciar con su procesamiento en el laboratorio. La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología descrita por Lodhi *et al.* (1994), con las modificaciones y optimizaciones realizadas por Rojas *et al.* (2007). La amplificación del ADN mediante la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa, por sus siglas en inglés) se realizó tomando como base la metodología descrita por Lowe *et al.* (2002) e igualmente se realizaron modificaciones a dicha metodología (Rojas *et al.* 2007). Todos los procedimientos de extracción, amplificación y corrido de electroforesis fueron validados para cada uno de los cinco loci disponibles, utilizando muestras vegetales de una misma planta (dos brotes tiernos) de diez clones diferentes de los 62 de la colección total (Rojas *et al.* 2007).

La calidad del ADN extraído fue evaluada en un gel de agarosa al 1%. Se comparó la concentración y el peso del ADN obtenido con un patrón de bandas a diferentes concentraciones conocidas. Se utilizó la cámara modelo 170-4401 de BIO-RAD. La electroforesis se efectuó durante 45 minutos, usando amortiguador TAE 1X a 75 Voltios constantes y 120 Amperios, empleando la fuente de poder EC452 (E-C Aparatus Corporation). El gel fue teñido con una solución de bromuro de etidio en una concentración de 0,5 ul/10 ml. Una vez finalizada la electroforesis y la tinción del gel, la visualización y análisis del ADN total se realizó con una lámpara de luz

ultravioleta.

Frecuencias alélicas y polimorfismo

Una vez establecido el genotipo de cada clon, mediante el número asignado a cada alelo (Rojas *et al.* 2007), se determinaron las frecuencias alélicas con los loci A1-20 y A1-15, por su mayor polimorfismo y calidad de resolución de bandas. El Contenido de Información Polimórfica (CIP) se obtuvo de la relación:

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

donde p_i es la frecuencia i de cada uno de los alelos registrados en un locus j .

Con base en el genotipo de cada clon para cada uno de los dos loci, se determinó finalmente la huella genética para 33 clones. Debido a que se presentaron problemas de amplificación y tinción, se decidió trabajar únicamente con los 33 clones que amplificaron bien con ambos loci. La diversidad genética fue determinada con base en las frecuencias alélicas de cada uno de los loci. Los valores de diversidad genética se calcularon según Gregorius (1978):

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

donde p_i es la frecuencia i de cada uno de los alelos en cada locus j analizado.

Una vez establecido el genotipo de los 33 clones con base en los dos loci utilizados, se procedió a determinar la distancia genética entre clones. Con base en la comparación y determinación del número de alelos que comparten los clones en cada locus, se estimó la distancia genética entre poblaciones (Gregorius 1978). La distancia genética fue calculada con el valor de similitud: Distancia Genética = 1 - Similitud.

Dónde similitud = $\frac{1}{j} * (No. alelos comunes / 2)$, y j es el número total de loci investigados.

Un segundo tipo de distancia genética fue determinada entre cada clon individual y el colectivo de todos los restantes 32 clones, tal y como lo sugiere Gregorius (1974), pero a nivel de poblaciones. Del grupo total se eliminó un clon a la vez y se obtuvieron las frecuencias alélicas de la subpoblación restante (submuestra de 32 clones), para cada uno de los dos loci investigados. De tal manera que, se calcularon las frecuencias alélicas para todas las posibles 32 subpoblaciones. Se obtuvo entonces la distancia genética entre cada clon individual y la subpoblación restante:

$D = \frac{1}{2} * \sum |p_i - p_i'|$; donde p_i = frecuencia del alelo i para el clon j ; p_i' = frecuencia alélica de la subpoblación de clones restantes para el alelo i .

Probabilidad de ocurrencia y apareo

Se calculó la probabilidad de ocurrencia de cada uno de los 49 posibles genotipos para cada locus, multiplicando la frecuencia de cada alelo respectivo. Al multiplicar las frecuencias de cada locus con los valores más altos, se obtuvo la probabilidad del genotipo más frecuente al usar ambos loci. Con los datos de probabilidad de ocurrencia

se calculó la probabilidad de apareo (sumatoria al cuadrado de cada una de las frecuencias) y ese dato fue utilizado para estimar el poder de discriminación (1-probabilidad de apareo).

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 con base en la estimación de distancia genética establecida por Nei y Li (1979), utilizando 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 una matriz de distancia genética. Este análisis permitió explicar similitudes-disimilitudes (distancias) observadas entre los elementos investigados, agrupándolos de acuerdo con la proporción de la variación.

Resultados

Frecuencias alélicas y polimorfismo

De los cuatro loci analizados, el mayor polimorfismo se registró en los loci 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).

Cuadro 1. Tamaño de alelos (pares de base) para 4 SSR evaluados en una población de clones de *Vochysia guatemalensis*, San Carlos, Costa Rica 2009

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

Con base en el número total de alelos de cada locus se pudo determinar que los cuatro loci analizados son altamente polimórficos para *V. guatemalensis*, con un rango entre cinco y siete alelos.

Las frecuencias alélicas se calcularon solamente para los loci A1-20 y A1-15, por ser los de mayor polimorfismo (Cuadro 2). 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.

Cuadro 2. Frecuencias alélicas para los loci A1-20 y A1-15 con 33 clones de *Vochysia guatemalensis*. San Carlos, Costa Rica 2009.

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

Se calculó también el contenido de información polimórfica (CIP). El CIP es un valor comúnmente usado para medir el grado de información de un marcador genético en una población, de acuerdo con 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 en esta investigación fue de 0,77.

Por otra parte, con respecto a la determinación de la huella genética, esta se logró para 33 clones y fue obtenida con base en la utilización de dos loci (Cuadro 3). Los clones 19-4 y 39-1, 101-8 y 200-2 y el grupo de clones 19-1, 19-6, 19-7 y 104-1, aparecen con el mismo genotipo. El resto de los clones registraron genotipos diferentes.

Cuadro 3. Huella genética de 33 clones de *Vochysia guatemalensis* usando dos loci microsatélites. San Carlos, Costa Rica 2009.

Clon	Locus A1-20		Locus A1-15	
19-1	A3	A3	C1	C3
19-4	A4	A4	C4	C5
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	A4	A4	C4	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

Cada sombreado representa el grupo de clones que registró el mismo genotipo

Debido a que varios de los clones son medios hermanos entre sí y al bajo número de familias evaluadas, las frecuencias alélicas que se exhiben en el cuadro 2 podrían estar sesgadas. En los cuadros 4 y 5, se muestra para cada locus las probabilidades de ocurrencia de cada genotipo. De tal modo que la probabilidad de ocurrencia del genotipo $A_3A_3C_1C_1$ 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).

Cuadro 4. Probabilidad de ocurrencia en la población de cada uno de los 49 posibles genotipos para el locus A1-20 en *V. guatemalensis*. San Carlos, Costa Rica 2009.

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

Puede observarse que los genotipos de mayor probabilidad de ocurrencia en cada locus (A_3A_3 y C_1C_1 ; $p = 0,0529$ y $0,2025$ respectivamente), como es de esperar, 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.

Cuadro 5. Probabilidad de ocurrencia en la población de cada uno de los 49 posibles genotipos para el locus A1-15 en *V. guatemalensis*. San Carlos, Costa Rica 2009.

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

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 entonces de 4,72. En el Cuadro 6 se muestra la matriz de todas las distancias genéticas obtenidas entre todos los 33 clones que amplificaron con base en los loci A1-20 y A1-15.

Cuadro 6. Matriz de distancia genética entre 33 clones de *Vochysia guatemalensis* mediante dos loci microsatélites. San Carlos, Costa Rica 2009.

Clon	103-4	41-4	101-3	120-3	200-2	120-4	101-8	120-1	120-5	103-2	120-8	104-5	102-5	41-2	19-4	39-1	104-2	101-6	101-1	104-1	119-1	39-2	101-2	19-8	36-1	103-1	19-7	19-1	30-1	101-4	19-6	119-2	200-4				
103-4	0																																				
41-4	0.25	0																																			
101-3	0.25	0.25	0																																		
120-3	0.25	0.5	0.5	0																																	
200-2	0.75	0.75	0.5	0.75	0																																
120-4	0.75	0.5	0.75	0.75	0.25	0																															
101-8	0.75	0.75	0.5	0.75	0	0.25	0																														
120-1	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0																													
120-5	0.5	0.75	0.75	0.5	0.25	0.25	0.25	0.75	0																												
103-2	0.75	1	1	0.75	0.5	0.5	0.5	1	0.25	0																											
120-8	0.25	0.25	0.25	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	1	0																										
104-5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.25	0.25	0.25	0.75	0.25	0.5	0.5	0																									
102-5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0																								
41-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0																							
19-4	1	1	0.75	1	0.75	1	0.75	1	1	1	1	1	0.25	0.5	0																						
39-1	1	1	0.75	1	0.75	1	0.75	1	1	1	1	1	0.25	0.5	0	0																					
104-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.25	0.25	0.5	0.5	0																				
101-6	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	0.75	0.5	0.5	0.75	1	0.75	0.75	0.75	1	0.5	0.5	1	0																			
101-1	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	1	0.75	0.75	1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0																		
104-1	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0																	
119-1	0.75	1	1	0.75	1	1	1	1	0.75	0.75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.5	0																
39-2	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	1	0.75	0.75	1	1	0.75	0.75	1	0.5	0.5	0.25	0.75	0															
101-2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0.75	0.75	1	1	0.5	1	0.5	1	0.75	1	0														
19-8	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	1	0													
36-1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	1	0.75	0.75	1	0.5	1	1	0.75	0.75	0.25	0.75	1	0.75	0.5	0.75	0												
103-1	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	1	0.75	1	1	0.75	0.75	0.25	0.5	0.75	0.75	0.5	0.5	0.25	0											
19-7	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0	0.5	0.25	1	0.5	0.75	0.5	0										
19-1	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0	0.5	0.25	1	0.5	0.75	0.5	0	0									
30-1	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	1	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0.5	0.5	0.5	1	0.75	0.75	0.75	0.5	0.5	0								
101-4	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	1	0.75	0.75	1	0.75	1	1	0.75	0.75	0.25	0.75	1	0.75	0.5	0.75	0.25	0.25	0.75	0.75	0.75	0							
19-6	0.5	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0	0.5	0.25	1	0.5	0.75	0.5	0	0	0.5	0.75	0						
119-2	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	0.75	1	0.75	0.75	1	1	0.75	0.75	1	0.5	0.5	0.5	0.5	0.25	1	0.75	0.75	0.75	0.5	0.5	0.25	0.75	0.5	0					
200-4	0.75	0.5	0.75	0.75	0.75	0.5	0.75	0.5	0.75	1	0.75	0.75	1	1	1	1	1	0.75	0.75	0.25	0.75	0.25	1	0.75	0.75	0.75	0.25	0.25	0.5	0.5	0.25	0.5	0				

Agrupamiento genético de la colección de clones

En el Cuadro 7 se muestra qué tan distante genéticamente es cada uno de los clones con respecto a la población total analizada (33 clones). El valor medio de distancia entre clones fue de un 68%. Esto implica que en promedio, los clones solamente 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 inclusive una distancia genética mayor al 80% con respecto al resto del grupo.

Cuadro 7. Distancia genética (Gregorius 1974) individual de cada clon de *Vochysia guatemalensis* con respecto al resto de clones de la población evaluada (33 clones). San Carlos, Costa Rica 2009.

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

La figura 1 por su parte, muestra el análisis de agrupamiento (dendrograma), en el cual se aprecia la formación de tres subgrupos. Las mayores similitudes (menores distancias genéticas) 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.

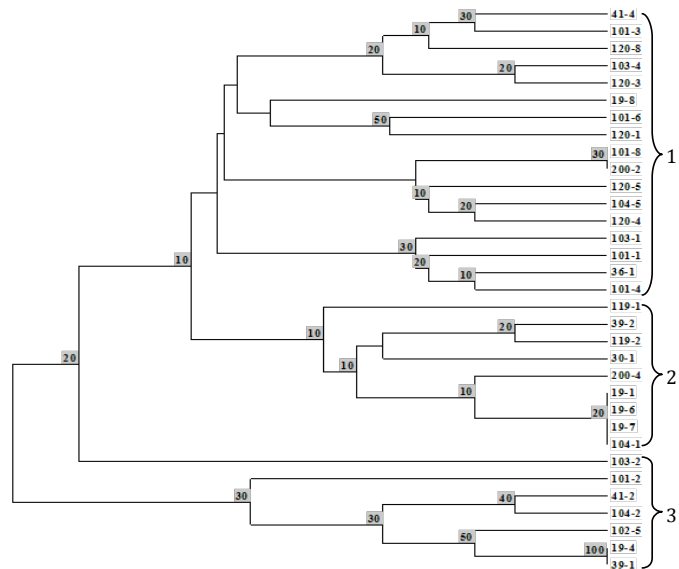


Figura 1. Dendrograma UPGMA basado en la distancia genética de 33 clones de *Vochysia guatemalensis* con los loci A1-20 y A1-15. San Carlos, Costa Rica 2009.

En la figura 2 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, como es de esperar, 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.

Se observa en la figura 1 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, los cuales muestran un 100% de similitud y valores de reemplazo de 30%, 20% y 100% respectivamente.

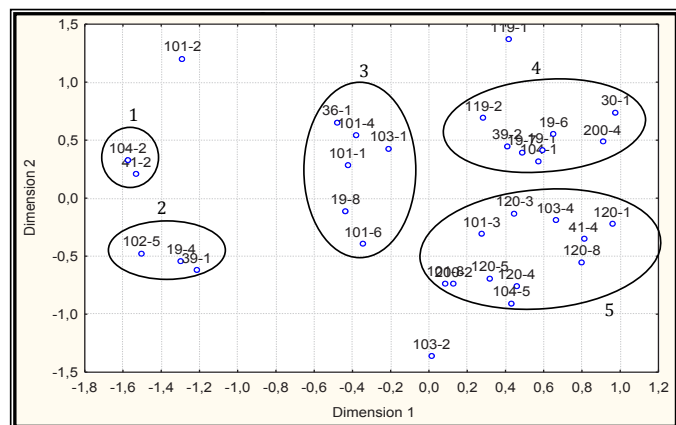


Figura 2. Análisis de ordenación "Multidimensional scaling" de 33 clones de *Vochysia guatemalensis* con los loci A1-20 y A1-15. San Carlos, Costa Rica 2009.

Discusión

Frecuencias alélicas y polimorfismo

El polimorfismo detectado concuerda con lo reportado para *V. ferruginea* por Lowe *et al.* (2002), quienes registraron siete alelos en el locus A1-20 y seis en el locus A1-15. Estos investigadores reportaron cinco alelos en el locus A1-5 para *V. ferruginea* como el de menor polimorfismo, el cual fue también en esta investigación el que presentó menor polimorfismo. Para el locus A1-20 se observó una mejor distribución alélica que en el locus A1-15, en el cual se observó tres alelos con frecuencias de un 3%, que podrían denominarse como alelos raros (Murillo y Finkeldey 2000).

En estudios con álamos se reportan valores promedio de CIP 0,69 y 0,37 para clones de dos cultivares distintos de álamo (Fossati *et al.* 2005). En estudios con cultivares de trigo se reportan valores de CIP desde 0,4 hasta 0,84; con un valor promedio de 0,72 (Manifesto *et al.* 2001). Podrían entonces considerarse valores ligeramente altos los registrados en esta investigación.

Esta colección de clones forma parte de una población de árboles seleccionados por sus buenas características (plus) para reforestación. De cada uno de estos árboles se eligieron en vivero de ocho a diez plántulas vigorosas (medios hermanos), las cuales se constituyeron en los clones investigados en este trabajo. Es de esperarse entonces, que la similitud genética entre algunos de estos clones, sea muy alta entre sí. Por ello, a pesar de esta estructura genética, los valores de CIP registrados pueden considerarse altos.

Además, gracias al alto polimorfismo registrado en los loci A1-20 y A1-15 (siete alelos cada uno), fue posible diferenciar claramente y sin ambigüedades a un 75% (25 clones) del grupo total de 33 clones. En el caso del grupo de clones 19-1, 19-6 y 19-7 ($A_3A_3C_1C_3$), al originarse del mismo árbol madre (número 19) y ser por tanto medios hermanos o hermanos completos, aumenta significativamente la probabilidad de heredar los mismos alelos por descendencia (consanguinidad). Por tanto, para esta situación, la probabilidad de que tres individuos dentro de una misma familia aparezcan con el mismo genotipo, es ahora de $0,47 \times 3 = 1,41\%$ (efecto aditivo de sus probabilidades individuales). Esto significa que la probabilidad de que este genotipo aparezca en la población es de un individuo en una muestra aleatoria de 200. La probabilidad de ocurrencia también se calculó para el genotipo más probable ($A_3A_3C_1C_1$) del total de genotipos registrados y se obtuvo un valor de 1,07%; dicho genotipo se observó solamente en el clon 200-4. Debe señalarse que, a pesar de que se utilizaron solamente dos loci, las probabilidades de ocurrencia son bajas. En el caso del clon 104-1 que registró el mismo genotipo que este grupo de tres clones de la familia 19, podría deberse a errores humanos durante el proceso de

etiquetado y manejo del material en el invernadero. De igual manera, con los clones 19-4 y 39-1 pudo haberse confundido el número de la familia 39 con la 19.

Asimismo, se calculó la probabilidad de apareo que es la que estima la posibilidad de que dos individuos seleccionados al azar en una población, tengan el mismo genotipo en relación con un marcador dado (Morales 1999). Al realizar la sumatoria de todas las frecuencias al cuadrado mostradas en los cuadros 4 y 5, se obtuvo la probabilidad de apareo de cada posible combinación alélica para cada locus. Para el locus A1-20 dicha probabilidad fue de 0,029 y para el locus A1-15 de 0,077; es decir, son las probabilidades de que dos individuos en una población de *V. guatemalensis* seleccionados al azar tengan el mismo genotipo en cada uno de los loci evaluados. Esto significa que, a pesar de utilizar solamente dos loci, la cantidad de alelos detectados para cada uno o grado de polimorfismo, permitió obtener una probabilidad de discriminación (1-probabilidad de apareo) de 97,1% para el locus A1-20 y de 92,3% para el locus A1-15. Es decir, que basados únicamente en esos dos loci en promedio el 94,7% de las veces se podrá distinguir entre dos individuos.

En el cuadro 4 se observa para el locus A1-20 diez posibles genotipos con frecuencias mayores al 3% y el genotipo más abundante en ese locus (A_3A_3) con una frecuencia del 5%. Mientras que para el locus A1-15 (cuadro 5), se observa solamente tres genotipos con frecuencias mayores al 3% y el genotipo más abundante (C_1C_1) con una frecuencia del 20%. Esto sugiere que el locus A1-20 mostró una mejor distribución de alelos que el locus A1-15. Al calcular la probabilidad de apareo con los dos loci en conjunto, se obtuvo una probabilidad de 0,0834; lo cual indica que la probabilidad de obtener al azar dos individuos con el mismo genotipo usando esos dos loci es de 8,34% y por tanto una probabilidad de discriminación de 91,66% al utilizar ambos loci. Esto explica la aparición de clones que aunque no sean de la misma familia registraron el mismo genotipo.

Desde luego, tal y como lo señala Morales (1999), entre más alelos tenga un locus, mejor sea su distribución de frecuencias y más loci sean analizados, más alto será el poder de discriminación. Por lo que es muy probable, que al incorporarse un mayor número de loci se pueda separar la identidad genética de los clones que registraron el mismo genotipo en esta investigación.

Diversidad y distancia genética

Un valor alto de diversidad indica un número significativo de alelos y una buena distribución en la población (Gregorius 1974, Murillo y Finkeldey 2000). Puede entonces observarse la superioridad en diversidad del locus A1-20 en relación con el locus A1-15, que refleja precisamente una mejor distribución alélica en el primero

de los casos. Al menos tres alelos del locus A1-15 registraron frecuencias de un 3%, lo que significa que se mantienen a través de un solo individuo heterocigoto en la población investigada. Su probabilidad de desaparecer de la población es por tanto muy alta.

Existen varios procedimientos para estimar la distancia genética entre poblaciones e individuos, siendo la establecida por Nei la más empleada (Yeh 2000). Sin embargo, en este estudio se tiene una única población, por tanto se decidió adaptar el principio del cálculo de la distancia genética entre poblaciones (Gregorius 1978), para aplicarlo a nivel de individuos dentro de la población. Algunos autores como Mohammadi y Prasanna (2003) indican que la distancia-similitud genética puede ser calculada entre genotipos, poblaciones o individuos mediante varias medidas estadísticas dependiendo del grupo de datos que se tenga.

Como era de esperar, las mismas parejas de clones que habían registrado el mismo genotipo (Cuadro 3), mostraron consecuentemente una distancia genética con valor cero en el Cuadro 6, lo cual coincide también con el agrupamiento realizado mediante el método UPGMA y a través del sistema de ordenación “multidimensional scaling” o MDS (Figuras 1 y 2).

Agrupamiento genético de la colección de clones

El agrupamiento de una colección de clones, con base en su similitud genética, es de gran importancia en programas de mejoramiento y conservación genética (Murillo 2005). Los agrupamientos son de utilidad a la hora de diseñar los cruzamientos controlados, con el fin de mantener la mayor diversidad genética posible en la población (Araya *et al.* 2005a). Si el objetivo es mantener la mayor variabilidad posible, se busca entonces que los grupos de cruzamiento se conformen con genotipos con la menor consanguinidad posible entre sí (mayor distancia genética entre individuos). Dado que la colección utilizada en este estudio proviene de árboles plus seleccionados de un ensayo de procedencias realizado por Cornelius y Masís (1994) como parte del programa de mejoramiento genético forestal desarrollado por el CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza), se conoce de antemano que en el material usado hay hermanos y medios hermanos. Además es una colección con gran variación genética y el material proviene de la selección de árboles plus colectados de distintas zonas geográficas, lo cual explica la baja tasa de consanguinidad encontrada (Cuadro 7) entre los clones de la colección investigada.

Los clones con valores de distancia genética mayores a 0,70 (Cuadro 7) indican que estos clones se encuentran alejados del núcleo de agrupación mostrado en la figura 2. Los valores entre 0,50 y 0,70 los registraron los clones ubicados cerca del núcleo de agrupación. Los clones que son ubicados como un solo genotipo en el dendrograma

(figura 1), corresponden tal como se esperaba con los clones que registraron el mismo genotipo (Cuadro 3). Estos resultados sugieren que los clones 19-4 y 39-1, 101-8 y 200-2 y el subgrupo 19-1, 19-6, 19-7 y 104-1 están genéticamente muy relacionados. Además, al tener la información de la procedencia del material (Cornelius y Masís 1994) es muy probable que los datos obtenidos con respecto a esos clones se deban a errores humanos de etiquetado, ya que por ejemplo el subgrupo de la familia 19, no es posible que agrupe con un clon de la familia 104 y que por el contrario el clon 19-4 que debería agrupar con ese subgrupo, tenga exactamente el mismo genotipo que el clon de la familia 39.

El valor de bootstrap generado en el análisis de agrupación con el software TREECON (figura 1), corrobora que el uso de dos loci no es concluyente, ya que puede observarse que para los clones 101-8 y 200-2 sólo un 30% de las veces se agruparán juntos como un mismo genotipo, así como el subgrupo 19-1, 19-6, 19-7 y 104-1 indica que un 20% de las veces que se repita el análisis agruparán como el mismo genotipo. La excepción se da en los clones 19-4 y 39-1, en los cuales el valor de bootstrap indica que el 100% de las veces que se repita ese análisis con dos loci siempre se ubicarán con el mismo genotipo; es decir, para esos clones gracias al nivel de polimorfismo detectado, estos caen dentro de la probabilidad de apareo obtenida (Cuadros 4 y 5).

En el análisis “multidimensional scaling” (figura 2) es de particular interés observar que aunque los clones se ordenan aproximadamente en cinco subgrupos, se mantiene el agrupamiento obtenido en el dendrograma (figura 1); es decir, los subgrupos tres y cinco del análisis de ordenación corresponden a los clones del subgrupo uno del dendrograma (clones con mayores similitudes). El subgrupo dos del dendrograma coincide con el subgrupo cuatro de la figura 2, a excepción del clon 119-1, mientras que, el subgrupo tres en el dendrograma incluye los subgrupos uno y dos del análisis “multidimensional scaling” con excepción de los clones 103-2 y 101-2. Eso nos indica que los clones de los subgrupos tres y cinco de la figura 2 están más relacionados genéticamente que los clones de los subgrupos cuatro y cinco. Además, los clones 119-1, 103-2 y 101-2 se observan distantes de los diferentes subgrupos en el análisis de ordenación (figura 2), por lo que según ese análisis esos clones no presentan relación genética con ninguno de los restantes clones, mientras que según el análisis de agrupamiento (figura 1) se encuentran relacionados con los clones del subgrupo dos y tres respectivamente.

Aunque en términos generales la agrupación de los clones es similar con ambos tipos de análisis, existen algunas diferencias. En el análisis de ordenación (figura 2) es posible observar que los clones 101-2, 119-1 y 103-2 se ubican muy alejados de los cinco subgrupos formados. En la figura 1 por su parte, se observa particularmente

que los clones 119-1 y 119-2 pertenecientes a la misma familia se ubican en el mismo subgrupo, al igual que los clones pertenecientes a las familias 101 y 103 con excepción de los clones 101-2 y 103-2. Según la figura 1, las únicas familias que se agrupan correctamente son la 119, 120, 30, 36 y 102; esas tres últimas debido a que solo se evaluó un hijo del árbol madre. Estos resultados sugieren que el análisis de agrupamiento UPGMA es un método más sensible y logra una mayor precisión en el agrupamiento de los genotipos por su distancia genética, aunque se debe señalar que se esperaba que los clones pertenecientes al mismo árbol madre se agruparan en un mismo subgrupo. Al utilizarse solamente dos loci para el análisis de distancia genética entre individuos, los valores son del orden de cero, 25, 50, 75 y 100%. Debe recordarse además, que los procedimientos usuales para estimar la distancia genética fueron desarrollados para utilizarse al nivel de poblaciones y en el presente estudio no se cuenta con diferentes poblaciones, sino con una sola población. Donde dentro de cada población existe un número de individuos que conjuntamente van a constituirse en frecuencias alélicas de todo el colectivo. En este caso, los individuos son la base de análisis.

De ese modo, los imprimadores (loci) A1-20 y A1-15 pueden resultar de utilidad para la certificación, la detección de duplicados en las colecciones y para asistir programas de mejoramiento y conservación genética en *V. guatemalensis*. Los datos sugieren la contaminación en la pureza genética de los jardines monoclonales; sin embargo, es necesario volver a examinar la colección incorporando más loci. Los resultados sugieren una alta variabilidad genética en la población de conservación de 33 clones de *V. guatemalensis* existente en el Instituto Tecnológico de Costa Rica. Futuros trabajos basados en un mayor número de loci, podrán continuar desarrollando y refinando el uso de marcadores genéticos en esta especie nativa, de gran potencial para la reforestación nacional.

Un mayor número de loci aumentará la precisión y capacidad de la técnica de los SSR, para poder discriminar genotípicamente pequeñas variaciones (mutantes) en los programas clonales. A pesar de que estos imprimadores fueron desarrollados para *V. ferruginea*, la importancia socio-económica y ambiental de estas dos especies amerita continuar con el desarrollo de microsatélites propios para cada una de las especies.

Conclusiones

1. Dos pares (A1-15 y A1-20) de imprimadores de los cinco desarrollados para *V. ferruginea*, suministraron información valiosa para distinguir y determinar la huella genética de 33 genotipos de *V. guatemalensis*.
2. Los loci A1-20 y A1-15 son altamente polimórficos para *V. guatemalensis* y pueden resultar de utilidad para la certificación, la detección de duplicados en las colecciones genéticas y para asistir programas de mejoramiento y conservación genética en *V. guatemalensis*.
3. La probabilidad de ocurrencia para el genotipo más probable ($A_3A_3C_1C_1$) del total de genotipos registrados utilizando los dos loci fue de 1,07%.
4. De los grupos de clones que registraron el mismo genotipo, los de la familia 19 con el genotipo $A_3A_3C_1C_3$ mostraron la mayor probabilidad de ocurrencia (0,47%).
5. La probabilidad de obtener al azar dos individuos en una población de *V. guatemalensis* con el mismo genotipo usando estos dos loci es de 8,34%.
6. A pesar de que el análisis está basado en dos loci, la probabilidad de exclusión o discriminación es alta (91,66%).

Recomendaciones

1. Es necesario volver a examinar la colección clonal estudiada incorporando otros loci que no han sido analizados.
2. Podría implementarse el desarrollo de imprimadores microsatélites propios para *V. guatemalensis*.

Agradecimientos

El presente trabajo tuvo el apoyo económico de la Fundación Costa Rica – USA (CRUSA), de las Vicerrectorías de Investigación de la Universidad de Costa Rica y del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y de la Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central de Costa Rica (FUNDECOR).

Referencias

- Alice, F; Montagnini, F; Montero, M. 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. 2005a. Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal. *Kurú: Revista Forestal.* 2(6):1-14. Nota Técnica. (en línea). Consultado 30 set. 2009. Disponible en http://www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/index.htm
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005b. Relaciones genéticas en una colección de clones de Gmelina arborea reveladas con marcadores AFLP. *Kurú: Revista Forestal.* 2(6):1-14. (en línea). Consultado 30 set. 2009. Disponible en http://www.tec.cr/sitios/Docencia/forestal/Revista_Kuru/index.htm
- Badilla, Y.; Rodríguez, L.; Murillo, O. y Obando, G. 2000. Avances en la clonación de cebo, botarrama, pilón y almendro. Programa de Mejoramiento y Conservación Genética de Especies Forestales. ITCR/FUNDECOR. Reporte de Investigación N° 1. Cartago, Costa Rica. 11 p.
- Cornelius, J; Masís, J. 1994. Mejoramiento genético y semillas forestales. Turrialba, CR, CATIE. Boletín No. 9:11-15.
- Delgado, A; Montero, M; Murillo, O; Castillo, M. 2003. Crecimiento de especies forestales nativas en la zona norte de Costa Rica. *Agron. Costarric.* 27:63-78.
- Finkeldey, R; Murillo, O. 1999. Contributions of subpopulations to total gene diversity. *Theor. Appl. Genet.* 98:664-668.
- Flores, E. 1993. *Vochysia guatemalensis*, *Vochysia ferruginea* y *Hyeronima alchorneoides*. Árboles y Semillas del Neotrópico 2:1-28.
- Flores-Vindas, E; Obando-Vargas, G. 2003. Árboles del trópico húmedo, Importancia socioeconómica. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. p. 827-833.
- Fossati, T; Zapelli, I; Bisoffi, S; Micheletti, A; Vietto, L; Sala, F; Castiglione, S. 2005. Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR. *Tree. Genet. Gen.* 1:11-19.
- Glaubitz, JC; Moran, GF. 2000. Genetic tools: The use of biochemical and molecular markers. In Young, A; Boshier, D; Boyle, T. (Eds). *Forest conservation genetics, principles and practice.* CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. p. 39-59.
- Gregorius, HR. 1974. Genetischer abstand zwischen populationen. I. zur konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genet.* 23:22-27.
- Gregorius, HR. 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biosci.* 41:253-271.
- Guo, X; Lestón, R. 1999. Linkage information content of polymorphic genetic markers. *Hum. Hered.* 49:112-118.
- Lodhi, M; Ye, G; Weeden, N; Reisch, B. 1994. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and Vitis species. *Plant Mol. Biol. Rep.* 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. *Mol. Ecol. Not.* 2:153-155.
- Manifesto, M; Schlatter, A; Hopp, H; Suárez, E; Dubcovsky, J. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers. *Crop Sci.* 41:682-690.
- Mesén, F; Trejos, E. 1997. Propagación vegetativa del San Juan (*Vochysia guatemalensis* Donn. Smith) mediante enraizamiento de estacas juveniles. *Revista Forestal Centroamericana* 6:19-24.
- Mohammadi, SA; Prasanna, BA. 2003. Analysis of genetic din crop plants-salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43:1235-1248.
- Morales, AI. 1999. Pruebas de marcadores genéticos. Laboratorio de criminalística. San José, CR, Editorial EUNED. Fascículo 3. p. 19-20.
- Murillo, O. 1997. Genetische untersuchungen in natürliche populationen von *Alnus acuminata* ssp arguta (Schlectendal) Furlow in Costa Rica und Panamá. Tesis Ph.D. Göttingen, DE, Cuvillier. p. 31-42. (Cap. 4. Representatividad de las muestras de campo en estudios de poblaciones basados en marcadores genéticos).
- Murillo, O; Rocha, O. 1999. Gene flow and geographic variation in natural populations of *Alnus acuminata* spp arguta (Fagales:Betulaceae) in Costa Rica and Panama. *Rev. Biol. Trop.* 47:739-753.
- Murillo, O; Finkeldey, R. 2000. Genetic diversity in natural populations of *Alnus acuminata* spp arguta (Schlectendal) Furlow in Costa Rica and Panama. *For. Genet.* 7:121-132.
- Murillo, O; Rojas, J.L.; Badilla, Y. 2003. Reforestación clonal. Editorial Tecnológica de Costa Rica. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, CR. 36 p.
- Murillo, O. 2005. Selecting populations for gene conservation purposes in forestry: A study case with *Alnus acuminata* in Costa Rica and Panama. *Sistemas y Recursos Forestales* 14:27-35.
- Nei, M; Li, WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:5269-5273.
- Quirós, M. 1999. Evaluación de la calidad de las plantaciones forestales del Proyecto de Especies Nativas de la Región Huetar Norte. Tesis B.Sc. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal. Cartago, CR. 90 p.
- Rojas, F. 2006. Evaluación de microsatélites para el análisis de las relaciones genéticas en clones de *Vochysia guatemalensis*. Tesis B.Sc. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal. Cartago, CR. 59 p.
- Rojas, F; Murillo, O; Araya, E; Aguilar, G; Rocha, O. 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; De Wachter, Y. 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.
- Yeh, FC. 2000. Population genetics. In Young, A; Boshier, D; Boyle, T. (Eds). *Forest conservation genetics, principles and practice.* CSIRO Publishing. Collingwood, Australia. p. 21-37.