

Marcadores moleculares en raicilla (*Psychotria ipecacuanha*)

Claudia Zúñiga V.¹
Johnny Peraza M.²
Tomás Palma Z.³

Palabras clave

Psychotria ipecacuanha, raicilla, marcadores moleculares, isoenzimas, RAPD.

Resumen

Se caracterizaron por medio de la técnica de isoenzimas y RAPD 5 ecotipos de (*Psychotria ipecacuanha*). Los resultados obtenidos son parciales; sin embargo, es clara la presencia de polimorfismos en las diferentes enzimas analizadas. En lo que se refiere a los análisis de RAPD, se presenta una diferencia clara entre el ecotipo Larga con relación a los otros. Sin embargo, al igual que en el análisis de isoenzimas, los datos no son concluyentes, pues tanto la cantidad de muestras analizadas como la cantidad de imprimadores utilizados no es suficiente para emitir conclusiones. Por otra parte, es importante resaltar el aporte de esta investigación, porque en la

literatura no se encontraron referencias específicas sobre estos ecotipos de la especie, siendo mencionados únicamente por Moreira (1997).

Introducción

La raicilla es una planta herbácea perenne de la familia de las Rubiáceas, de 30 a 40 cm de altura, que se encuentra en la zona de vida del Bosque Húmedo Tropical, con una precipitación entre 2 500 y 3 500 mm, a alturas de hasta 900 msnm y temperaturas entre los 23 y 30 °C. En Costa Rica se localiza en la Región Huetar Norte, que incluye las provincias de Alajuela y Heredia, bajo la sombra de los árboles ya que no necesita de mucha luz para desarrollarse (Ocampo, 1986).

Esta planta posee gran importancia económica, porque de ella se obtienen los alcaloides emetina, cefalina, psicotrina, éter metílico de psicotrina y emetamina;

1. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, correo electrónico: czuniga@itcr.ac.cr
2. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica, correo electrónico: jperaza@itcr.ac.cr
3. Escuela de Agronomía. Instituto Tecnológico de Costa Rica, correo electrónico: tpalma@costarricense.cr

además, por ser nativa y encontrarse en los remanentes del bosque, se convierte en un excelente candidato para ser considerada como un producto no maderable del bosque (Moreira, 1997). Asimismo, contiene un glucósido cristalino (ipeacuana), ácido de ipeacuana, almidón y oxalato de calcio.

Los alcaloides se localizan en el tallo subterráneo o rizoma, que posee una longitud variable entre 15 a 27 cm. Estudios realizados por Ocampo (1986) indican que el contenido de alcaloides de plantas con edades de 2 a 3 años, proveniente de materiales cultivados en la Zona Norte de Costa Rica fue de 1,7 a 2,3 por ciento de alcaloides totales. En donde la emetina representó entre el 60 y 70 por ciento del total.

La especie desarrolla sus poblaciones en un variado número de hábitat locales (biotopos), condicionados por los factores del medio. Esta diferenciación es una de las causas de la discontinuidad fisiológica y morfológica que existe entre las poblaciones y conlleva al desarrollo de caracteres hereditarios, en donde las poblaciones originadas de esta manera se llaman ecotipos (Moreira, 1997).

En Costa Rica, al nivel de campo, Moreira (1997) identificó cinco ecotipos, con base en la forma de la hoja, el tipo de ápice, el tipo de base, la venación, la coloración y la textura de esta. Estos ecotipos se denominan: hoja larga, hoja blanca, hoja corriente, hoja crespada de montaña o chiriza y hoja oreja de mula o peracita.

Debido a la importancia comercial de la raicilla, se hace necesario realizar estudios genéticos para determinar si existen diferencias entre los genotipos, y posteriormente, mediante el análisis fitoquímico, seleccionar los que produzcan mayor contenido de alcaloides, para su propagación masiva y distribución a los productores.

El uso de marcadores bioquímicos y moleculares, a diferencia de los morfológicos, que se ven muy influidos por las condiciones del medio, no posee

tantas limitantes (Caetano-Anollés y Gresshoff), además de que se permiten hacer evaluaciones aun cuando la planta está en sus primeros estados de desarrollo. Las isoenzimas son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato común, pero que difieren en su movilidad electroforética. Los marcadores producidos por medio de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) se basan en la estructura del ADN, utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), con imprimadores cortos al azar y poseen gran cantidad de aplicaciones.

Por lo anterior, es que el objetivo de esta investigación consistió en caracterizar los ecotipos de raicilla con base en sus características bioquímicas y moleculares, utilizando las técnicas de isoenzimas y RAPD.

Metodología

Análisis isoenzimático

Recolección de muestras

Se colectaron muestras foliares de 28 individuos que forman parte de una colección en la sede regional del Instituto Tecnológico de Costa Rica en San Carlos (Cuadro N.º 1). Las muestras fueron colocadas inmediatamente en bolsas plásticas humedecidas y mantenidas en hielo hasta ser llevadas al laboratorio. El procesamiento de las muestras se hizo tan pronto como fue posible y se evitó el almacenamiento.

Preparación de las muestras para electroforesis

Las muestras foliares fueron maceradas con aproximadamente un doble de volumen de tres diferentes amortiguadores de extracción (Cuadro N.º 2) en nitrógeno líquido. Los 84 diferentes extractos resultantes fueron alicuotados en microtubos y corridos en electroforesis o almacenados a -20 °C hasta ser usados. El día de la corrida electroforética se descongelaron y centrifugaron

Cuadro N.º 1					
Muestras de Psychotria ipecacuanha colectadas para el análisis isoenzimático					
N.º	Código	Ecotipo	N.º	Código	Ecotipo
1	BLA1	Hoja blanca	15	PER5	Peracita
2	BLA2	Hoja blanca	16	PER6	Peracita
3	BLA3	Hoja blanca	17	LAR1	Hoja larga
4	BLA4	Hoja blanca	18	LAR2	Hoja larga
5	BLA5	Hoja blanca	19	LAR3	Hoja larga
6	BLA6	Hoja blanca	20	LAR4	Hoja larga
7	CHI1	Chiriza	21	LAR5	Hoja larga
8	CHI2	Chiriza	22	LAR6	Hoja larga
9	CHI3	Chiriza	23	COR1	Corriente
10	CHI4	Chiriza	24	COR2	Corriente
11	PER1	Peracita	25	COR3	Corriente
12	PER2	Peracita	26	COR4	Corriente
13	PER3	Peracita	27	COR5	Corriente
14	PER4	Peracita	28	COR6	Corriente

las muestras que inicialmente fueron almacenadas, manteniéndolas en

hielo hasta ser colocadas en el gel de electroforesis.

Cuadro N.º 2	
Buffer de extracción examinados	
<i>Buffer</i> de extracción	Ingredientes
Buffer N.º 1	Tris-HCl, pH 8,3 0,05 M Sacarosa 20% PVP-40 5% Tritón X-100 0,5% 2-mercaptoetanol 0,1%
Buffer N.º 2	Tris HCl 1M pH 7,8 al 5% Glicerol 20% 2-mercaptoetanol 0,4%
Buffer N.º 3	Tris HCl 1M pH 7,8 al 5% Glicerol 20% 2-mercaptoetanol 0,4% PVP-40 5%

Prueba y selección de amortiguadores de extracción

Se realizaron extracciones iniciales con tres diferentes recetas de amortiguadores

de extracción. Estas extracciones fueron evaluadas electroforéticamente para seleccionar el amortiguador de extracción que muestre los mejores resultados.

Electroforesis de isoenzimas

Las electroforesis fueron realizadas en geles de almidón y acetato de celulosa de acuerdo con las técnicas descritas por Soltis y Soltis (1989) y Kreutzer *et al.* (1983). Las condiciones para la electroforesis y los componentes del revelador se presentan en el Cuadro N.º 3.

Se analizaron los siguientes sistemas enzimáticos: glucosa fosfato deshidrogenasa

(**GPI**) EC 5.3.1.9; fosfoglucomutasa (**PGM**) EC 2.7.5.1; 6-fosfogluconato deshidrogenasa (**6-PGDH**) EC 1.1.1.44; manosa fosfato isomerasa (**MPI**) EC 5.3.1.8; glucosa 6-fosfato deshidrogenasa (**G6PDH**) EC 1.1.1.49; malato deshidrogenasa (**MDH**) EC 1.1.1.37; menadiona reductasa (**MNR**) EC 1.6.99.-; shikimato deshidrogenasa (**SKDH**) EC 1.1.1.25.

Cuadro N.º 3
Condiciones para la electroforesis y los componentes del revelador*

Enzima	Buffer tanque	Voltaje	T.corrida (minutos)	Buffer	Componentes del revelador reacción(para preparar 60 mL)
6PGDH	1	180	15	A	Acido fosfogluconico 15 mg; MgCl 120 mg; MTT tetrazolium(MTT) 15 mg; B-nicotinamida adenin dinucleotico fosfato(TPN) 15 mg; fenazina metosulfato (PMS) 10 mg; EDTA 60 mg.
GPI	2	180	15	A	Fructosa-6-fostato 20 mg; MgCl 120 mg; MTT 15 mg; B-TPN 15 mg; PMS 10 mg;Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 25 U; EDTA 60 mg.
PGM	2	200	15	A	D-glucosa 1-fosfato 200 mg; D-glucosa 1,6-difosfato 1.2 mg; MgCl2 120 mg; MTT 15 mg; B-TPN 15 mg; PMS 10 mg; Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 25 U;EDTA 60 mg.
MPI	3	160	15	B	Manosa 6-fosfato 20 mg; MgCl2 40 mg; B-NADP 15 mg; MTT 15 mg; PMS 10 mg; fosfogluconasa isomerasa 40 U; glucosa 6-fosfato deshidrogenasa 15 U.
G6PDH	1	180	15	A	D-glucosa 6-fosfato 75 mg; MgCl 120 mg; MTT tetrazolium(MTT) 15 mg; B-nicotinamida adenin dinucleotico fosfato (TPN) 15 mg; fenazina metosulfato (PMS) 10 mg; EDTA 60 mg.
MDH	2	180	15	A	DL-ácido málico 15 mg; MTT tetrazolium(MTT) 15 mg; B-nicotinamida adenin dinucleotico (NAD) 15 mg; fenazina metosulfato (PMS) 10 mg.
MNR	2	180	15	A	Menadiona 20 mg; NADH 10 mg; MTT tetrazolium(MTT) 15 mg.
SKDH	2	180	15	A	Ácido shikímico 45 mg; MgCl 120 mg; MTT tetrazolium(MTT) 15 mg; B-nicotinamida adenin dinucleotico fosfato (TPN) 15 mg; fenazina metosulfato (PMS) 10 mg.

*** Buffer Tanque**

1. Adicione Na2HPO4 0,2 M a Na2HPO4 0,2 M hasta alcanzar un pH de 7,0.
2. Tris 0.1 M/Acido maleico 0.1 M/EDTA 0.1 M/MgCl2 0,1 M; ajustar a pH 7,4 con NaOH 40%.
3. Tris 0.05M/NaH2PO4 0.05M; ajustar a pH 8,3 con NaOH 40%.

Buffer membrana

MPI: 1 parte de buffer tanque y 5 partes de agua destilada.

Todas las otras enzimas: 1 parte de buffer tanque y 14 partes de agua destilada.

Buffer reacción

A. Tris 0,06; ajustar a pH 8,0 con HCL 50%.

B. Tris 0,2M; ajustar a pH 7,5 con HCL 50%.

Análisis de RAPDs

Extracción del ADN

Las muestras foliares se obtuvieron de los ecotipos de raicilla denominados hoja larga (L), hoja blanca (BL), hoja corriente (C), hoja chiriza (CH) y hoja peracita (P). Las muestras se colectaron en la sede del Instituto Tecnológico en Santa Clara, San Carlos. Se recolectaron hojas jóvenes de 4 plantas de cada ecotipo, a excepción de Peracita y Chiriza, que en el momento de la colecta se disponía solo de 3 ejemplares (Cuadro N.º 4). Todas las muestras se transportaron al laboratorio dentro de bolsas plásticas en hielo en escamas.

El ADN se extrajo de 0,5 g de material vegetal por el método Dellaporta et al. (1983). Los botones obtenidos se resuspendieron en 50 µl de agua destilada y se congelaron a -20 °C.

Cuadro N.º 4 Muestras de <i>Psychotria ipecacuanha</i> colectadas para el análisis de RAPDs	
Código	Ecotipo
BL1	Hoja blanca
BL2	Hoja blanca
BL3	Hoja blanca
BL4	Hoja blanca
CHI1	Chiriza
CHI2	Chiriza
CHI3	Chiriza
PER1	Peracita
PER2	Peracita
PER3	Peracita
LAR1	Hoja larga
LAR2	Hoja larga
LAR3	Hoja larga
LAR4	Hoja larga
COR1	Corriente
COR2	Corriente
COR3	Corriente
COR4	Corriente

4. Madriz, J. 2001. Comunicación personal. Universidad Nacional. Costa Rica.

Amplificación del ADN de las plantas

Se utilizaron las siguientes mezclas de reactivos para los PCR: 2.0 µL MgCl₂, 2,0 µL de dATP, dCTP, dGTP, dTTP a 2,5 mM cada uno: 5 µL a 10mM de cada imprimador, 0,3ul Taq polimerasa (Promega, EE. UU.), 2,5 µL del tampón 10x (Promega, EE. UU.), 8,2 µL de agua bidestilada estéril y 5 µL de la muestra. El volumen total de la reacción fue de 25 µL. El ADN viral se amplificó en un termociclador Genius Buch & Hdm A/S por 40 ciclos de desnaturalización, hibridación y extensión, con las siguientes condiciones: 1 ciclo a 94 C por 90 segundos, 40 ciclos de 94 C por 30 seg, 35 C por 30 seg y 72 C por 60 seg, y un ciclo final de 72 C por 3 minutos.

Selección de los marcadores moleculares

A pesar de que se hizo una búsqueda de literatura para determinar los imprimadores que dan polimorfismo en Rubiáceas, los datos en este sentido son escasos, por lo que se decidió, debido tanto a la disponibilidad de tiempo como de recursos, a escoger los imprimadores siguiendo recomendaciones de otros laboratorios, que utilizan regularmente esta técnica⁴. Los imprimadores utilizados fueron A-01, A-09, CO-01, CO-02 de Operon Technologies, Inc. (California).

Detección de similitudes y diferencias entre individuos en un gel de agarosa

Los fragmentos de ADN amplificados se analizaron por la técnica de electroforesis en geles de agarosa al 1,5%, en tampón TBE 0,5X (tris borato, EDTA pH 8, 0,5M), a voltaje constante de 100v, durante 1 hora (Sambrook et al. 1989). A 5 µL de la muestra se le adicionó 1 µL de tampón de carga de 6x (gliceroal al 5 por ciento, azul de bromofenol al 0,005 por ciento y xileno de cianol al 0,05 por ciento). Las bandas de ADN de los geles de agarosa se tiñeron con bromuro de etidio al 0,5 µg/mL diluido con agua (Gibco BRL®, EE. UU.), el cual

cuando se une al ADN es fluorescente bajo la luz ultravioleta. Las bandas se visualizaron en un transiluminador ultravioleta de alta longitud de onda (300 nm). Se tomó una fotografía utilizando una cámara digital Epson PC3100Z. La información obtenida se analizó, para encontrar diferencias entre las bandas.

Resultados

Análisis isoenzimático

Electroforesis de isoenzimas

De los tres diferentes tipos de buffer de extracción probados se seleccionó el N.º 3. Con este Buffer se hicieron la mayoría de los análisis electroforéticos posteriores con las 28 muestras colectadas.

Aunque han sido examinados 8 diferentes sistemas enzimáticos solo se obtuvieron resultados satisfactorios con 4 sistemas. Estos son: MNR, GPI, MDH y PGM. En la Figura N.º 1 se muestran los resultados de las electroforesis de isoenzimas obtenidos con estos sistemas.

Análisis de los sistemas enzimáticos

De los sistemas enzimáticos analizados, el locus más anódico (más rápido) es nombrado con la letra “A” y el próximo con la “B”, etc. Dentro de estos loci, las bandas individuales fueron marcadas con números; se señaló la banda más rápida como 1, la próxima 2, etc. Las bandas que tuvieron igual movilidad se consideraron como el mismo alelo. Los genotipos y alelos obtenidos se presentan en el Cuadro N.º 5.

Grado de heterocigocidad

Después de la interpretación y descripción de los genotipos se calcula el grado de heterocigocidad observado. La heterocigocidad observada, Hobs, es la proporción de todos los genotipos heterocigotos expresada como un porcentaje de todos los loci. Se obtuvieron 18 genotipos heterocigotos de un total de 72 genotipos.

$$Hobs = 18 / 72 = 0.25 \text{ _ } 25\%$$

Muestra	MNR	GPI	MDH	PGM
fi & ' ½	-	--	→ → →	
fi & ' i	-	--	—	---
CHI3	-	--	→ → →	—
LAR1	-	--	→ → →	---
LAR2	-	--	→ → →	—
LAR3	-	--	→ → →	---
BLA1	-	--	—	→
BLA2	-	--	—	→
BLA3	-	--	—	---
PER1	-	--	—	---
PER2	-	--	→ → →	---
PER3	-	--	→ → →	→
COR1	-	--	—	→
COR2	-	--	—	— →
COR3	-	--	—	→
COR4	-	--	—	→
COR5	-	--	—	
COR6	-	--	—	

Figura N.º 1. Representación esquemática de los perfiles electroforéticos de 4 sistemas enzimáticos en 28 muestras de *Psychotria ipecacuanha*. Las bandas ubicadas más hacia la derecha (anódicas) de cada sistema son los alelos más rápidos.

Cuadro N.º 5
Genotipos obtenidos de Psychotria ipecacuanha con los
sistemas enzimáticos MNR, GPI y MDH

Genotipo			
Muestra	MNR	GPI	MDH
CHI1	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
CHI2	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
CHI3	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
LAR1	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
LAR2	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	A ₁ A ₂
LAR3	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
BLA1	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
BLA2	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	B ₁ B ₂
BLA3	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	B ₁ B ₂
PER1	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
PER2	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
PER3	-	-	A ₁ A ₂
COR1	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
COR2	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
COR3	A ₁ A ₁	A ₁ A ₁ /B ₁ B ₁	A ₁ A ₂
COR4	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
COR5	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂
COR6	A ₂ A ₂	A ₁ A ₁ /B ₂ B ₂	B ₁ B ₂

Estructura genética

La estructura genética es la medida de la distribución de los alelos en los respectivos *loci*. Esta es la fracción de

un cierto alelo de la cantidad total de alelos. La estructura genética encontrada en los individuos analizados es mostrada en el Cuadro N.º 6.

Cuadro N.º 6
Frecuencias alélicas de Psychotria ipecacuanha obtenidas por
electroforesis de isoenzimas

LOCUS	A ₁	A ₂	B ₁	B ₂
MNR	0,29 (10/34)	0,71 (24/34)	-	-
GPI	1,0 (34/34)	0	0,53 (18/34)	0,47 (16/34)
MDH	0,5 (9/18)	0,5 (9/18)	0,5 (9/18)	0,5 (9/18)

Análisis de RAPDs

Detección de similitudes y diferencias entre individuos en un gel de agarosa

Se obtuvieron bandas polimórficas en las amplificaciones realizadas en las bandas observadas en los gels de agarosa con el imprimador OPA-09, que permitieron separar el ecotipo Larga (Figura N.º 2).

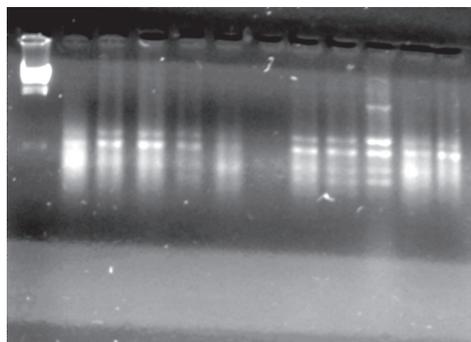


Figura N.º 2

Patrones de fragmentos obtenidos de la reacción de amplificación utilizando muestras de ADN genómico de diferentes individuos de *Psychotria ipecacuanha* y el iniciador OPA-09. Se observa el patrón diferente de bandas en el carril 10, correspondiente al ecotipo Larga.

Sin embargo, con los otros imprimadores no se observaron diferencias en el patrón de bandas de cada ecotipo o no se obtuvo amplificación.

Cuadro N.º 7
Tipos de amplificación obtenida con los imprimadores utilizados en *Psychotria ipecacuanha* mediante la técnica de RAPD

Imprimador	Tipo de amplificación
A-09	Polimórfica
A-01	No polimórfica
CO-01	No amplifica
CO-02	No amplifica

Discusión

El estudio de la variación isoenzimática en plantas ofrece varias ventajas sobre otras medidas de variación genética. La electroforesis en gels de almidón es la técnica frecuentemente usada en estudios de variación isoenzimática, pues es relativamente barata y se puede aplicar a muchas especies de plantas. En la presente investigación se usó esta técnica para la valoración de la mayoría de las muestras analizadas; sin embargo, también se han hecho electroforesis usando la técnica de acetatos de celulosa. La experiencia hasta el momento ha mostrado que ambas técnicas ofrecen resultados satisfactorios donde cada una ofrece ventajas diferentes.

La toma de las muestras para electroforesis es generalmente no destructiva, dado que relativamente muy poco material es necesitado y muchos loci enzimáticos son expresados en diferentes estados del ciclo de vida. Así, aun en especies en peligro de extinción se pueden analizar sin riesgo. Además, muchos loci enzimáticos tienen herencia mendeliana discreta. Como un resultado, la interpretación genética de poblaciones naturales puede ser hecha sin preocuparse por los efectos ambientales en el fenotipo expresado. Dado que muchos loci enzimáticos son codominantes, las frecuencias alélicas y genotípicas se pueden calcular directamente. Los resultados obtenidos hasta el momento son parciales; sin embargo, es clara la presencia de polimorfismos en las diferentes enzimas analizadas, incluyendo varias no mostradas en el presente documento.

Los resultados obtenidos a la fecha indican que se presenta una diferencia clara entre el ecotipo Larga con relación a los otros. Sin embargo, al igual que en el análisis de isoenzimas, los datos no son concluyentes, pues tanto la cantidad de muestras analizadas como la cantidad de imprimadores utilizados no es suficiente para emitir conclusiones.

Lo recomendable sería utilizar más imprimadores, como hicieron Aabdallah *et al.*, que usaron 122 imprimadores para establecer diferencias y evaluar cuatro cultivares de palma datilera, lo cual permite también aplicar un análisis estadístico.

Además, se deben de optimizar las condiciones de amplificación, porque se obtienen relativamente poco número de bandas. Sin embargo, es importante destacar que los resultados obtenidos con el ecotipo Larga se presentaron en cuatro muestras diferentes y sus repeticiones, obteniéndose un máximo de 5 bandas por individuo.

Finalmente, es importante resaltar el aporte de esta investigación preliminar, porque en la literatura no se encontraron referencias específicas sobre estos aspectos de *P. ipecacuanha*, pues sólo una referencia (Moreira 1997) hace mención a los ecotipos que aquí se evaluaron.

Bibliografía

Aabdallah, B.; Kadija, P.; Lepoivre, P. 2000. "Identification de cultivars de palmier dattier (*Phoenix dactylifera*

L.) par l'amplification aléatoire d'ADN (RAPD)." Cahiers d'études et de recherches francophones. *Agricultures* 9(2):103-107.

Caetano-Anollés, G. y Gresshoff, P.M. 1997. *DNA markers. Protocols, Applications and Overviews*. Wiley-Liss, Inc. New York. 364 pp.

Dellaporta, S.L.; Wood, J. y Hicks, J.B. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Molecular Biology Reporter* 1:19-21.

Kreutzer, R.D.; Semko, M.E.; Hendricks, L.D. y Wright N. 1983. Identification of leishmania spp. by multiple isozyme analysis. *Am.J.Trop.Med.Hyg.* 32:703-715.

Moreira, I. 1997. Determinación de ecotipos de raicilla (*Psychotria ipecacuanha*). *Tecnología en Marcha* 13(1):37-48.

Ocampo, R. 1986. *El cultivo de ipecacuana en Costa Rica*. Programa Cooperativo UCR-IDA. En: Memoria "Seminario Cultivo y utilización de las plantas medicinales de Costa Rica. Colegio de Ingenieros Agrónomos, 17 pp.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York Book.

Soltis, D.E. y P.S. Soltis. 1989. *Isozymes in plant biology*. *Dioscorides Press*. Oregon. 267 pp.