



ARTÍCULO / ARTICLE

ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DEL GERMOPLASMA DE TECA (*Tectona grandis* L. f.) EN ECUADOR

ANALYSIS OF GENETIC DIVERSITY OF TEAK (*Tectona grandis* L. f.) GERMPLASM IN ECUADOR

José Enrique Nieto-Rodríguez¹, Sanjuana Hernández-Delgado², Emmerik Motte-Darricau³ y Netzahualcóyotl Mayek-Pérez²

RESUMEN

La teca (*Tectona grandis*) es una especie originaria de Indochina que fue introducida a Ecuador en 1950, donde actualmente tiene alta demanda en el sector maderero. Existen escasos estudios locales que abordan temas de genética de poblaciones y mejoramiento en especies forestales de importancia económica en el país, lo cual es fundamental para conocer la diversidad y las relaciones entre poblaciones y fuentes de semilla, así como para identificar ejemplares que resistan condiciones adversas, ya que son los más aptos para utilizarse en la obtención de individuos con mayor productividad y rendimiento mediante herramientas biotecnológicas. El presente trabajo tuvo como objetivo analizar la diversidad y las relaciones genéticas de diez poblaciones de teca (seis de Ecuador, tres de Costa Rica y una de Honduras) con marcadores RAPD. El análisis de datos indicó la formación de dos grupos poblacionales, uno incluyó a las de Ecuador y el otro se conformó con las de Costa Rica y Honduras. Las poblaciones ecuatorianas, probablemente, provienen de Pichilingue (INIAP) o Granada, que a su vez son los más antiguas y con mayor diversidad genética en el país. Las introducciones posteriores de la especie, procedentes de Centroamérica, no resultaron emparentadas con las previamente establecidas. Los resultados evidencian la variabilidad de la teca como producto de la constante polinización libre y natural, así como la introducción de nuevas fuentes génicas.

Palabras clave: Análisis RAPD, genética de poblaciones, litoral ecuatoriano, marcadores moleculares, *Tectona grandis* L. f., variabilidad genética.

ABSTRACT

Teak (*Tectona grandis*) is a native species of Indochina that was introduced in 1950 into Ecuador, where it is currently in high demand in the timber industry. There are few local studies on population genetics and on the improvement of economically important forest species in this country, despite the fact that such studies are essential to find out about the diversity of and the relationships between populations and seed sources, as well as to identify the specimens that are resistant to adverse conditions, since these are the most suitable for the obtainment of specimens with a higher productivity and yield through the use of biotechnological tools. The purpose of this study was to analyze the genetic diversity of and relationships between ten teak populations (six from Ecuador, three from Costa Rica, and one from Honduras) with RAPD markers. The data analysis pointed at the formation of two population groups -one of which included the populations from Ecuador, while the other comprised those from Costa Rica and Honduras. The Ecuadorian populations probably come from those of Pichilingue (INIAP) or Granada, which are the oldest and the richest in genetic diversity in the country. Later introductions of the species from Central America had no kinship with those previously established. The results evince the variability of teak as the product of the ongoing free natural pollination, as well as of the introduction of new gene sources.

Key words: RAPD analysis, population genetics, Ecuadorian coastline, molecular markers, *Tectona grandis* L. f., genetic variability.

Fecha de recepción/date of receipt: 1 de abril de 2013; Fecha de aceptación/date of acceptance: 20 de noviembre de 2013.

¹ Unidad de Investigación Científica y Tecnológica de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo.

² Centro de Biotecnología Genómica, Instituto Politécnico Nacional. Correo-e: nmayek@ipn.mx

³ Laboratorio de Biotecnología, Universidad de Guayaquil.

INTRODUCCIÓN

La teca (*Tectona grandis* L. f.) es un árbol originario de Indochina que se introdujo en los países tropicales de América Latina hace aproximadamente 100 años. Se estima que, actualmente, sus plantaciones en el mundo alcanzan los 3 millones de hectáreas (Centeno, 1997). En el caso que compete a Ecuador, esta especie se adaptó y adquirió gran importancia económica y ecológica por su rápido crecimiento, la calidad de madera y su gran aportación de biomasa al suelo (Hartmann *et al.*, 1990), que se ha traducido en una alta demanda en programas de reforestación para zonas con problemas de sequía. Su madera es apreciada por sus excepcionales cualidades de dureza, resistencia, facilidad para su trabajo y que no se oxida ni corroe en contacto con metales (Gupta *et al.*, 1980), por lo que resulta ideal para las industrias mueblera, naval y de la construcción. Es valorada por su aspecto estético, con tonos desde el dorado hasta el marrón oscuro, pasando por tonos rojizos, con fibras rectas y textura fina. Además, la elevada concentración de aceites naturales le confiere un carácter untuoso y características únicas como: resistencia al agua, a la humedad y a las condiciones de sol y lluvia (Ramos, 2000).

El primer cultivo se estableció en la Estación Experimental Tropical "Pichilingue" del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), localizado en Quevedo, Ecuador, cuyo germoplasma provenía de la India. A partir de esa población, se generaron los plantíos comerciales en el país; sin embargo se desconoce el origen de los demás campos forestales actuales en el litoral ecuatoriano, ya que pueden derivar de Quevedo, o de otra procedencia. La reproducción de *T. grandis* se realiza por semilla; es decir, por vía sexual; generalmente, los individuos que las aportan no son seleccionados ni por su origen ni por sus características físicas, lo que propicia una alta variabilidad fenotípica y genotípica en las parcelas (Dunsdon y Simons, 1996). La disponibilidad de germoplasma mejorado genéticamente y que provenga de áreas productoras de semillas o huertos semilleros en Ecuador es nula; y aún no existen programas destinados al mejoramiento de la especie.

A pesar de su importancia y potencial forestal, las investigaciones a la fecha, se concentran en técnicas de propagación vegetativa, cultivo de tejidos *in vitro*, modelos y densidades de plantación, estudios de mercado y biotecnología (Dalmay *et al.*, 2004). Se necesita realizar trabajos orientados al conocimiento genético de la especie dentro del país que permitan la implementación de planes de manejo y mejora genética; asimismo, conocer los patrones de variabilidad del germoplasma permitirá determinar su potencial para la formulación y ejecución de programas destinados a su conservación y a establecer las bases para estructurar un programa integral para hacer más productivo y rentable el aprovechamiento de uno de los árboles de mayor importancia nacional y así, contribuir al desarrollo del sector.

INTRODUCTION

Teak (*Tectona grandis* L. f.) is a native tree of Indochina that was introduced into the tropical countries of Latin America approximately 100 years ago. Today, the surface covered by teak plantations across the world is estimated in 3 million hectares (Centeno, 1997). In Ecuador this species adapted itself and acquired a great economic and ecologic importance due to its rapid growth, to the high quality of its wood, and to its considerable contribution of biomass to the soil (Hartmann *et al.*, 1990), all of which have increased its demand in reforestation programs for areas affected by drought. Its wood is appreciated due to its exceptional qualities of hardness, resistance and workability, and because it does not rust and is not corroded by contact with metals (Gupta *et al.*, 1980), all of which render it ideal for the furniture industry, shipbuilding and construction. It is valued for its aesthetic aspect, ranging from a dark brown through reddish hues to gold, with straight fibers and a fine texture. Besides, its high content of natural oils makes it oily and resistant to water, to humidity and to the sun and the rain (Ramos, 2000).

The first crop was established at the "Pichilingue" Tropical Experimental Station of the National Institute of Research on Agriculture and Livestock (Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias, INIAP), located in Quevedo, Ecuador, and its germplasm was native of India. The commercial plantations of the country are all derived from that population. However, the origin of the remaining forestry fields in the Ecuadorian coastline is unknown, as these trees may have come from Quevedo or elsewhere. *T. grandis* is reproduced through its seeds, i.e. sexually; the individuals that provide the seeds are generally not selected by their origin or by their physical characteristics, and therefore a high variability of phenotypes and genotypes may be found in each plot (Dunsdon and Simons, 1996). The availability of genetically improved germplasm from seed-producing areas or seed orchards is non-existent in Ecuador, and no programs destined to improve the species exist yet.

Despite its importance and its potential in forestry, research focuses so far on vegetative propagation techniques, the *in vitro* culture of tissues, planting models and densities, and marketing and biotechnological studies (Dalmay *et al.*, 2004). Work oriented toward the genetic knowledge of the species within the country is required in order to implement management and genetic improvement plans. Furthermore, knowledge of the germplasm variability patterns will make it possible to determine its potential in the formulation and execution of programs for the preservation of teak -one of the most important trees in the country- and in setting the bases for the structuring of an integral program to render its exploitation of more productive and profitable, thereby contributing to the development of this sector.

The purpose of this research was to analyze the genetic diversity of and relationships between the various teak seed

La presente investigación tuvo como objetivo analizar la diversidad y las relaciones genéticas con fuentes de semilla de teca entre poblaciones del Ecuador y otros países de América, con base en técnicas de biología molecular, mediante RAPD (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), que constituyen una herramienta importante para este tipo de estudios (Neale y Sederoff, 1991; Ahuja, 2001).

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Se estudiaron 10 poblaciones de *T. grandis* distribuidas en distintas localidades del macrositio denominado "litoral ecuatoriano" (Cuadro 1, Figura 1), que se caracteriza por tener condiciones de bosque húmedo tropical, cálido y que se desarrolla en altitudes menores a 200 m (Nieto - Rodríguez *et al.*, 2013). Cuatro poblaciones provenían de la región de Guayas, tres de Los Ríos y tres de Costa Rica. En cada sitio se recolectaron muestras de hojas jóvenes de 10 plantas; dicho material se almacenó y procesó en el Laboratorio del Programa de Biotecnología de la Universidad de Guayaquil, en Guayaquil, Ecuador.

A excepción del germoplasma de Pichilingue, que constituye la introducción original de teca a Ecuador, se asume que el restante del país fue propagado a partir de este mismo. La población de La María es originaria de Honduras y las tres poblaciones de Costa Rica se conservan en Quevedo, Ecuador.

sources of the Ecuadorian populations and of those of other countries in the American continent, based on molecular biology techniques that utilize RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), an important tool for this type of studies (Neale and Sederoff, 1991; Ahuja, 2001).

MATERIALS AND METHODS

Biological material

Ten *T. grandis* populations distributed in various locations within the macrosite known as the "Ecuadorian coastline" (Table 1, Figure 1), characterized by having the conditions of a warm, humid tropical forest, and located at altitudes below 200 m (Nieto - Rodríguez *et al.*, 2013). Four populations came from the Guayas region, another three from Los Ríos, and three more from Costa Rica. Samples of young leaves of 10 plants were collected in each site; these materials were stored and processed at the Biotechnology Program Laboratory of the University of Guayaquil, in Guayaquil, Ecuador.

It is assumed that all the germoplasms propagated across the country are derived from that of Pichilingue, which is the original point of introduction of teak into Ecuador. The population from La María is native to Honduras, and the three Costa Rican populations are preserved in Quevedo, Ecuador.

Cuadro 1. Origen de las poblaciones de *Tectona grandis* L. f. en Ecuador utilizadas en el estudio de diversidad genética.
Table 1. Origin of the *Tectona grandis* L. f. populations in Ecuador utilized in the genetic diversity study.

Región	Localidad	País
Guayas	El Empalme	Ecuador
Guayas	Granada	Ecuador
Guayas	San Nicolás	Ecuador
Guayas	Balzar	Ecuador
Los Ríos	Alba Isabel	Ecuador
Los Ríos	Pichilingue, INIAP	India
Los Ríos	La María	Honduras
Costa Rica	Santa Cruz; Guanacastle	Costa Rica
Costa Rica	Parritas; Querpus; Punta Arenas	Costa Rica
Costa Rica	Pillangosta; Hojancha; Guanacastle	Costa Rica



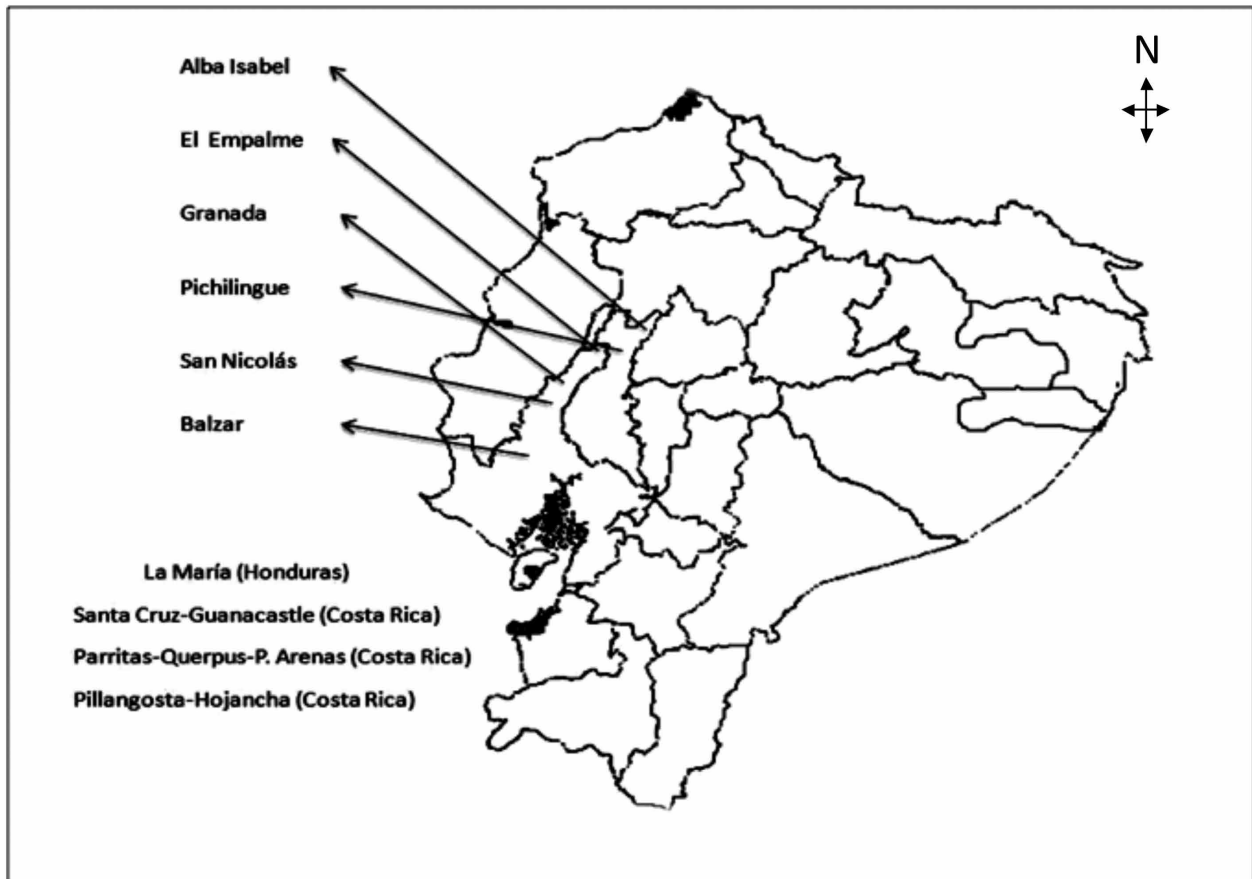


Figura 1. Origen de las poblaciones de *Tectona grandis* L. f. en Ecuador.
 Figure 1. Origin of the *Tectona grandis* L. f. populations of Ecuador.

La población de La María se cultivó cerca del INIAP - Pichilingue; mientras que las de Costa Rica provienen directamente de dicho país.

The population of La María was cultivated near INIAP - Pichilingue, while those of Costa Rica came directly from Ecuador.

Evaluación de protocolos de extracción de ADN

Para la extracción y purificación del ADN se evaluaron tres protocolos: Dellaporta *et al.* (1983), Doyle y Doyle (1987) y Uyemoto *et al.* (1998). El primero consistió en macerar tejido con nitrógeno líquido (-196 °C) hasta obtener un polvo fino. Se añadió buffer de extracción (100 mM Tris - HCl, pH 9; 500 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercaptoetanol; SDS 20 %) y se incubó en baño maría a 65°C durante 10 min. Se añadió acetato de potasio, centrifugó a 1 700 rpm por 30 min y se dejó reposar de 12 h a 20 °C. Se realizó una segunda centrifugación para formar la pastilla de ADN y retirar el isopropanol, a la que se adicionó solución para diluir (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM EDTA); posteriormente, se aplicó fenol - cloroformo (25:1), se centrifugó y se extrajo el sobrenadante para nuevamente colocarse en isopropanol (400 mL y acetato de sodio (60 mL). Una vez formado el *pellet*, se retiró el resto al invertir el tubo Eppendorf y se dejó secar 15 min. Las muestras se lavaron con etanol 70 % dos veces y se resuspendieron en TE 1X.

Assessment of the DNA extraction protocols

Three protocols for DNA extraction and purification were assessed: Dellaporta *et al.* (1983), Doyle y Doyle (1987) and Uyemoto *et al.* (1998). The first consisted in macerating tissue with liquid nitrogen (at -196 °C) until a fine dust is obtained. Extraction buffer (100 mM Tris - HCl, pH 9; 500 mM EDTA; 500 mM NaCl; 10 mM β-mercaptoethanol; SDS 20 %) was added and incubated in a double boiler at 65 °C during 10 mins. Potassium acetate was added, centrifuged at 1 700 rpm for 30 mins and allowed to settle for 12 h at 20 °C. A second centrifugation was carried out to form the DNA pellet and remove the isopropanol, to which a diluting solution (50 mM Tris-HCl, pH 8 y 10 mM EDTA) was added; phenol - chloroform (25:1) was applied and centrifuged, and the supernatant was extracted in order to place it again in isopropanol (400 mL and sodium acetate (60 mL). Once the pellet was formed, the remainder was removed by inverting the Eppendorf tube and was left to dry during 15 mins. The samples were rinsed twice with ethanol 70 % and were suspended again in TE 1X.

El protocolo de Doyle y Doyle (1987) consistió en macerar de 25 a 50 mg de tejido con nitrógeno líquido y se agregaron 700 mL de buffer de extracción (2 % CTAB, 1.42M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris HCl, pH 8.0 y 2 % PVP 40), precalentado a 65 °C. Se añadieron 0.5 mM de ácido ascórbico modificado (0,2 % de β - mercaptoetanol) para después centrifugar 2 min a 13 000 rpm., se recuperó el sobrenadante y se agregaron 4 mL de ARNasa (10 mg mL⁻¹), se mezcló por inversión y se incubó 5 min a 65 °C. Posterior a ello, se agregaron 570 mL de cloroformo isoamílico (24:1) y se centrifugó a 13 000 rpm por 10 min a temperatura ambiente. Luego, se precipitó el ADN al adicionar 0.7 vol de isopropanol frío y se centrifugó 5 min. a 13 000 rpm. Por último, la pastilla se lavó con etanol 70 % y el ADN se resuspendió en 15 μ L de TE 1X.

El protocolo de Uyemoto *et al.* (1998) consistió en colocar el amortiguador CTAB a 65 °C durante 15 min (2 % CTAB; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA, pH 8; 100 mM Tris HCl, pH 8; 0.2 % de β -mercaptoetanol y agua ultrapura). En seguida, se maceraron 100 mg de tejido vegetal y se añadieron 800 mL del amortiguador CTAB para después incubar 20 min a 60 °C; se centrifugó 2 min a 13 000 rpm y se recuperó el sobrenadante, al que se agregaron 600 mL de cloroformo - isoamílico 24 : 1 para luego centrifugar 5 min a 13,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo limpio al que se adicionó 1 vol de isopropanol frío; y la mezcla se colocó 10 min en hielo para precipitar el ADN. Se centrifugó 8 min a velocidad máxima, a continuación la fase acuosa se desechó. La pastilla se enjuagó con etanol 80 % y se secó al ambiente, para después resuspenderla en 25 mL de TE. Finalmente, se agregó RNAsa (10 μ g mL⁻¹) y se incubó 1 h a 37 °C.

El ADN procedente de cada uno de los protocolos se visualizó en gel de agarosa 1.2 %. Para determinar la eficiencia de los procedimientos se evaluó tanto la cantidad como la calidad del ADN obtenido, con base en los valores de pureza, cantidad y absorbancia en un espectrofotómetro con luz UV Lambda 40 (Perkin Elmer®). Además, al ADN extraído se le hicieron pruebas de digestibilidad, estabilidad y amplificación por PCR con ayuda de oligonucleótidos decaméricos OPA 15 y OPC 7 de la casa Operon® (Operon Technologies) (Nieto-Rodríguez *et al.*, 2005).

Análisis a través de RAPD

El análisis con RAPD se desarrolló de acuerdo con el protocolo descrito por Williams *et al.* (1990). La técnica consiste en una PCR con volumen total de reacción de 25 mL que incluye Taq DNA polimerasa, dNTPs, cloruro de magnesio y buffer para PCR. Las condiciones utilizadas para la amplificación constaron de tres segmentos: el primero de desnaturalización a 94 °C por 1 min; el segundo de 40 ciclos con desnaturalización a 94 °C por 1 min, hibridación a 36 °C por 1.30 min y polimerización a 72 °C por 2 min; así como uno final de polimerización de 10 min a 72 °C. Los fragmentos se separaron por electroforesis a 65 V

The Doyle and Doyle protocol (1987) consisted in macerating 25 to 50 mg of tissue with liquid nitrogen and adding 700 mL of extraction buffer (2 % CTAB, 1.42M NaCl, 20mM EDTA, 100mM Tris HCl, pH 8.0 y 2 % PVP 40), pre-warmed at 65 °C. 0.5 mM of modified ascorbic acid (0,2 % β - mercaptoethanol) were added and then centrifuged during 2 mins at 13 000 rpm.; the supernatant was recovered, and 4 mL of RNAase (10 mg mL⁻¹) were added, mixed by inversion and incubated during 5 min. at 65 °C. Subsequently, 570 mL of isoamyl chloroform (24:1) were added and centrifuged at 13 000 rpm during 10 mins at room temperature. The DNA was then precipitated by adding 0.7 vol of cool isopropanol and was centrifuged during 5 mins at 13 000 rpm. Finally, the pellet was rinsed with ethanol 70 %, and the DNA was suspended once more in 15 μ L of TE 1X.

The protocol of Uyemoto *et al.* (1998) consisted in placing the CTAB buffer at 65 °C during 15 mins (2 % CTAB; 1.4 M NaCl; 20 mM EDTA, pH 8; 100 mM Tris HCl, pH 8; 0.2 % of β -mercaptoethanol and ultrapure water). Immediately after, 100 mg of vegetable tissue were macerated, and 800 mL of the CTAB buffer were added and then incubated during 20 mins at 60 °C; they were centrifuged for 2 mins at 13 000 rpm; the supernatant was recovered, and 600 mL of isoamyl chloroform 24:1 was added and centrifuged for 5 mins at 13 000 rpm. The supernatant was transferred to a clean tube, to which 1 vol of cool isopropanol was added, and the mixture was placed during 10 mins in ice in order to precipitate the DNA. It was centrifuged for 8 mins at maximum speed, and then the aqueous phase was discarded. The pellet was rinsed with ethanol 80 % and was left to dry in order to be suspended once more in 25 mL of TE. Finally, RNAse (10 μ g mL⁻¹) was added and incubated during 1 h at 37 °C.

The DNA from each of the protocols was visualized in 1.2 % agarose gel. In order to determine the efficiency of the procedures, both the quantity and the quality of the DNA obtained were assessed -based on the values of purity, quantity and absorbance- in a Lambda 40 UV PerkinElmer® spectrophotometer. Furthermore, the extracted DNA was tested for digestibility, stability and PCR amplification with Operon® OPA 15 and OPC 7 decameric oligonucleotides (Operon Technologies) (Nieto-Rodríguez *et al.*, 2005).

Analysis with RAPD

The analysis with RAPD was developed according to the protocol described by Williams *et al.* (1990). The technique consists in a PCR with a total reaction volume of 25 mL that includes Taq DNA polimerase, dNTPs, magnesium chloride and buffer for PCR. The conditions utilized for the amplification comprised three segments: the first, of denaturing at 94 °C during 1 min; the second, of 40 cycles with denaturation at 94 °C during 1 min; hybridation at 36 °C during 1.30 min, and polymerization at 72 °C during 10 mins. The fragments were separated using

por 150 min en un gel de agarosa 1.4 %. La visualización de los productos de PCR se realizó en un trans iluminador con luz UV.

Análisis estadístico

Se amplificaron quince iniciadores decaméricos (*Operon Technologies*) en tres muestras (INIAP - India, Santa Cruz - Costa Rica y Granada - Ecuador) y se seleccionaron los oligonucleótidos con mayor número de bandas amplificadas (OPA 12; OPA 16; OPA 15; OPC 1; OPC 4; OPC 7; OPC 8; OPC 9 y OPC 10). La lectura de los geles RAPD se efectuó de manera directa mediante la asignación del número uno a la banda con mayor peso molecular y así sucesivamente, en orden descendente hasta la banda con menor peso molecular en el gel. Para cada oligonucleótido se calcularon las bandas amplificadas, en las que se denominó como 1 a la presencia de una banda y 0 a la ausencia de la misma. Se asumió que las bandas con igual velocidad de migración en el gel en individuos diferentes eran idénticas.

Con los datos binarios se elaboraron matrices que fueron utilizadas para calcular las distancias genéticas entre poblaciones con base en el coeficiente de apareamiento simple (Nei y Li, 1979). Con estas, se construyó un dendrograma, según el método de agrupamiento de pares no ponderados con medias aritméticas (UPGMA) (Nei y Kumar, 2000). Los valores de diversidad para cada iniciador se calcularon por ecotipo, con base en la distancia de Nei (1978):

$$h_k = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad (1)$$

Donde:

p = Frecuencia de la banda en las poblaciones
 n = Número de individuos analizados

El valor de la diversidad genética que se detectó con cada oligonucleótido fue calculado con base en la estimación de r . El valor de diversidad de todas las muestras (H) se calculó con base en el número total de marcadores e individuos analizados y al utilizar la ecuación:

$$H_T = \sum_{k=1}^r \frac{h_k}{r} \quad (2)$$

Donde:

h_k = Medias ponderadas por el valor de todos los marcadores
 r = Número de marcadores revelados por cada oligonucleótido

electrophoresis at 65 V during 150 mins in a 1.4 % agarose gel. The visualization of the products of PCR was carried out in a UV transilluminator.

Statistical analysis

Fifteen decamer primers (*Operon Technologies*) were amplified in three samples (INIAP - India, Santa Cruz - Costa Rica and Granada - Ecuador), and the oligonucleotides with the largest number of amplified bands (OPA 12; OPA 16; OPA 15; OPC 1; OPC 4; OPC 7; OPC 8; OPC 9 and OPC 10) were selected. The RAPD gels were read directly, assigning the number 1 to the band with the heaviest molecular weight, and so on, down to the band with the lightest molecular weight in the gel. The amplified bands were estimated for each oligonucleotide, indicating the presence of a band with the number 1 and its absence with the number 0. It was assumed that bands with the same migration speed within the gel in different individuals were identical.

The binary data served to build matrices that were utilized to estimate the genetic distances between populations based on the simple pairing coefficient (Nei and Li, 1979). A dendrogram was built with these, following the method of the unweighted pair group with arithmetic mean (UPGMA) (Nei and Kumar, 2000). The diversity values for each primer were estimated by ecotype, based on Nei's distance (1978):

$$h_k = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) \quad (1)$$

Where:

p = Band frequency in the populations
 n = Number of individuals analyzed

The value of the genetic diversity detected with each oligonucleotide was calculated based on the estimation of r . The diversity value of all the samples (H) was calculated based on the total number of markers and individuals analyzed, using the equation:

$$H_T = \sum_{k=1}^r \frac{h_k}{r} \quad (2)$$

Where:

h_k = Means weighted by the value of all the markers
 r = Number of markers revealed for each oligonucleotide

The similarity matrix was also utilized to carry out a hierarchic analysis of molecular variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 2005) as described by Huff *et al.* (1993) with the Arlequin 2.0 software (Schneider *et al.*, 1997).

Like the original cluster analysis, the strength of the RAPD dendrogram was evaluated by bootstrapping and generating

La matriz de similitud también se usó para realizar un análisis jerárquico de varianza molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 2005) como fue descrito por Huff *et al.* (1993), con el programa Arlequin 2.0 (Schneider *et al.*, 1997).

La robustez del dendrograma RAPD se evaluó mediante el remuestreo y la generación de 1 000 matrices de distancias genéticas generadas a partir de matrices de distancias reconstruidas y reducidas, como se hizo el análisis de conglomerados original (Nei y Li, 1979; Skroch *et al.*, 1992), de modo que se estimaron los límites de confianza de cada comparación apareada (Felsenstein, 1989). La topología del dendrograma de consenso resultante fue comparada del original. El análisis de robustez se llevó a cabo con el programa *FreeTree* (Hapl *et al.*, 2001) y se visualizó con el programa *TreeView* versión 1.6.6 (Page, 2000).

La estructura de las poblaciones se infirió con base en el algoritmo de agrupamiento con un modelo Bayesiano, para lo que se utilizó el programa de cómputo STRUCTURE versión 2.3.4 (Pritchard y Wen, 2000; Pritchard *et al.*, 2010); el cual se corrió considerando *K* conglomerados genéticos, caracterizados con las matrices de frecuencias de alelos. Así, se estimó la proporción del genoma por individuo derivado de cada conglomerado genético (proporción de ascendencia). Se efectuaron 20 corridas independientes con *K* de 1 a 10, con 30 000 repeticiones de Cadenas de Markov - Monte Carlo (CMCMC) y 300 000 periodos de rodaje (*burn-in periods*), así como un modelo de "mezcla" y frecuencias de alelos correlacionadas. El valor óptimo de *K* se calculó de acuerdo con los criterios de Evanno *et al.* (2005), con el programa *Harvester* versión 0.56.4 (Earl and von Holdt, 2012).

RESULTADOS

Evaluación de protocolos de aislamiento de ADN

El protocolo de aislamiento de ADN de Uyemoto *et al.* (1998) fue el único cuyo ADN se pudo amplificar mediante PCR. Las pruebas de amplificación con dos oligonucleótidos decaméricos RAPD (OPA 15 y OPC 7) se hicieron con ADN aislado a partir de los tres protocolos y se generaron perfiles genéticos con 9 y 11 bandas, respectivamente. La concentración del ADN aislado causó problemas en las amplificaciones preliminares debido a su alta concentración ($\geq 500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) y, por consiguiente las muestras se diluyeron 1: 20 para el análisis con RAPD. Mediante el protocolo de Uyemoto *et al.* (1998) se obtuvieron valores promedio de pureza de $1.40 \text{ } 260 \times 280^{-1}$; concentración de $560 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ y absorbancia de 0.265.

Análisis a través de RAPD

El análisis de RAPD se desarrolló con nueve iniciadores decaméricos, y generó 111 bandas en las diez poblaciones de

1 000 genetic distance matrices based on reconstructed and reduced distance matrices (Nei and Li, 1979; Skroch *et al.*, 1992), so that the confidence limits were estimated for each paired comparison (Felsenstein, 1989). The topology of the resulting consensus dendrogram was compared with the original. The strength analysis was performed with the *FreeTree* software (Hapl *et al.*, 2001) and was visualized with *TreeView*, version 1.6.6 (Page, 2000).

The structure of the populations was inferred based on the Bayesian clustering algorithm, using STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard and Wen, 2000; Pritchard *et al.*, 2010), which was run taking into account the *K* genetic clusters, which were characterized by means of allele frequency matrices. Thus, the proportion of the genome for each individual derived from each genetic cluster (ancestry proportion) was estimated. The software was run on 20 separate occasions with 1 to 10 *K*, with 30 000 repetitions of Markov Chains Monte Carlo (MCMC) and 300 000 burn-in periods, as well as "mixture" models and correlated allele frequencies. The optimal value for *K* was estimated based on the criteria of Evanno *et al.* (2005), with version 0.56.4 of the *Harvester* software (Earl and von Holdt, 2012).

RESULTS

Assessment of DNA isolation protocols

The DNA isolation protocol by Uyemoto *et al.* (1998) was the only one in which the DNA could be amplified with PCR. The amplification tests with two RAPD decamer oligonucleotides (OPA 15 and OPC 7) were carried out with isolated DNA based on the three protocols, and genetic profiles with 9 and 11 bands, respectively, were generated. The high concentration ($\geq 500 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$) of isolated DNA caused problems in the preliminary amplifications, and therefore the samples were diluted at 1:20 for the analysis with RAPD. Using the protocol of Uyemoto *et al.* (1998), the following mean values were obtained: $1.40 \text{ } 260 \times 280^{-1}$ for purity; $560 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ for concentration, and 0.265 for absorbancy.

Analysis with RAPD markers

The analysis with RAPD markers was developed with nine decamer primers and it generated 111 bands in the ten *T. grandis* populations. These bands had a high reproducibility and resolution; 28 of them were monomorphic, while 83 (74.9 %) were polymorphic (Table 2). The molecular weight interval of the amplified products was 0.4 to 2.5 Kb, and the number of amplified products for each population ranged between 10 and 14. The percentage of polymorphic markers was 85.7 % for OPC 9 and up to 64.2 % for OPC 4.

T. grandis, dichas bandas tuvieron alta reproducibilidad y resolución, detectándose 28 productos monomórficos y 83 polimórficos (74.9 %) (Cuadro 2). El intervalo de peso molecular de los productos amplificados fue de 0.4 a 2.5 Kb y el número de productos amplificados, por población, varió de 10 a 14. El porcentaje de marcadores polimórficos correspondió a 85.7 % para el OPC 9 y de hasta 64.2 % para OPC 4.

The AMOVA showed significant differences between the two analyzed hierarchies: the teak populations of the Ecuadorian coastline and those of other countries. The highest proportion of molecular variance was determined between populations (Table 3). The value $F_{ST}=0.56$ evinced a high genetic differentiation between and within the analyzed populations. The dendrogram of the populations showed two groups, one

Cuadro 2. Productos amplificados con nueve iniciadores RAPD en diez poblaciones de *Tectona grandis* L. f. de Ecuador.
Table 2. Amplified products with nine RAPD primers in ten *Tectona grandis* L. f. populations of Ecuador.

Iniciador RAPD	Productos Amplificados		Polimorfismo (%)
	Monomórficos	Polimórficos	
OPC 1	4	9	69.2
OPC 4	5	9	64.2
OPC 7	3	8	72.7
OPC 8	3	9	75.0
OPC 9	2	12	85.7
OPC 10	4	10	71.4
OPA 12	2	8	80.0
OPA 15	2	10	83.3
OPA 16	3	8	72.7
Total	28	83	74.9

El AMOVA indicó diferencias significativas entre las dos jerarquías analizadas: poblaciones de teca del Litoral Ecuatoriano y del extranjero. La mayor proporción de la varianza molecular se determinó entre poblaciones (Cuadro 3). El valor $F_{ST}=0.56$ evidenció alta diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones analizadas. El dendrograma de poblaciones mostró la formación de dos grupos, uno incluyó aquellas que se localizan en Ecuador y el otro, a las del extranjero (Figura 2).

made up of those located in Ecuador, and the other, of those located elsewhere (Figure 2).

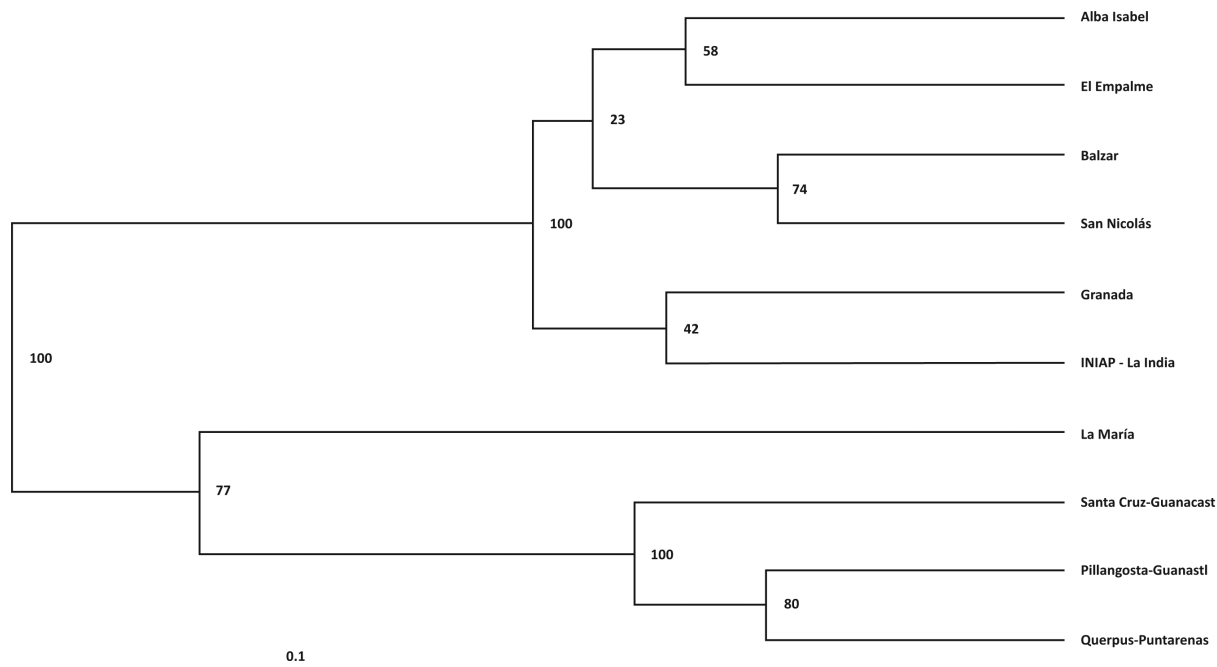
The analysis with the OPA 15 and OPA 16 RAPD primers produced high levels of diversity in teak. The H_t value was 0.71 (Table 4). The populations located in El Empalme, Alba Isabel, San Nicolás, Balzar, Granada and Pichilingue are genetically similar and confirm the theory that the first introduction of teak in

Cuadro 3. Análisis de varianza molecular de poblaciones de *Tectona grandis* L. f. del Litoral Ecuatoriano y aquellas introducidas al Ecuador.

Table 3. Analysis of molecular variance of *Tectona grandis* L. f. populations native to the Ecuadorian coastline and those introduced into Ecuador.

Fuente de variación	g. l.	Suma de cuadrados	Porcentaje de variación	p
Entre grupos	1	102.5	44.3	<0.0001
Dentro de grupos	8	128.5	55.6	<0.0001
Total	9	231.0		





Los números en los nodos representan los valores de robustez (%) para 1 000 repeticiones.
 The numbers in the nodes represent the strength values (%) for 1 000 repetitions.

Figura 2. Dendrograma de consenso para las poblaciones de *Tectona grandis* L. f. con base en datos RAPD y el método UPGMA.

Figure 2. Consensus dendrogram for the *Tectona grandis* L. f. populations based on the RAPD data and on the UPGMA method.

El análisis con los iniciadores RAPD OPA 15 y OPA 16 produjeron altos niveles de diversidad en teca. El valor H_r fue de 0.71 (Cuadro 4). Las poblaciones de El Empalme, Alba Isabel, San Nicolás, Balzar, Granada y Pichilingue son genéticamente similares y corroboran la teoría de que la primera introducción de teca al Ecuador ocurrió en Pichilingue (población 4) y de esta última, aparentemente, se originaron las otras poblaciones de establecidas a lo largo del litoral Ecuatoriano.

Para $K = 2$ el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano discriminó las poblaciones ecuatorianas de las demás. Los resultados obtenidos con $K = 2$ fueron consistentes (Figura 3), de acuerdo con el cálculo de los valores de ΔK .

Ecuador occurred in Pichilingue (population 4), and apparently all the other populations established along the Ecuadorian coastline are derived from this one.

The Bayesian cluster analysis for $K = 2$ discriminated between the Ecuadorian populations and the others. The results obtained with $K = 2$ were consistent (Figure 3), according to the estimated ΔK values analysis ($K = 2$).

DISCUSSION

The extraction of the DNA of plants containing large amounts of polyphenols, tannins and polysaccharides is complex (Webb



Cuadro 4. Diversidad genética de las diez poblaciones de *Tectona grandis* L. f. analizadas, con base en nueve oligonucleótidos RAPD.
Table 4. Genetic diversity of the ten analyzed populations of *Tectona grandis* L. f., based on nine RAPD oligonucleotides.

Población	Oligonucleótido RAPD									
	OPC1	OPC 4	OPC7	OPC8	OPC9	OPC10	OPA12	OPA15	PA16	Ht
Empalme	0.78	0.38	0.70	0.75	0.67	0.67	0.84	0.88	0.79	0.72
Granada	0.62	0.58	0.79	0.93	0.97	0.81	0.84	0.88	0.86	0.81
San Nicolás	0.71	0.38	0.70	0.82	0.81	0.91	0.84	0.88	0.86	0.77
Balzar	0.78	0.38	0.70	0.82	0.87	0.81	0.64	0.65	0.86	0.72
Alba Isabel	0.52	0.13	0.70	0.75	0.81	0.75	0.84	0.82	0.70	0.67
Pichilingue	0.40	0.26	0.79	0.82	0.81	0.81	0.91	0.88	0.86	0.73
Honduras	0.40	0.75	0.47	0.65	0.38	0.48	0.36	0.55	0.70	0.53
Santa Cruz	0.62	0.67	0.79	0.82	0.87	0.87	0.75	0.65	0.59	0.74
Parritas	0.62	0.75	0.79	0.65	0.91	0.87	0.51	0.82	0.70	0.73
Pillangosta	0.71	0.58	0.70	0.65	0.81	0.81	0.51	0.82	0.59	0.69
H	0.62	0.49	0.71	0.77	0.79	0.78	0.70	0.79	0.75	$H_T=0.71$

Ecuatorianas = Ecuadorian; No Ecuatorianas = Non Ecuadorian

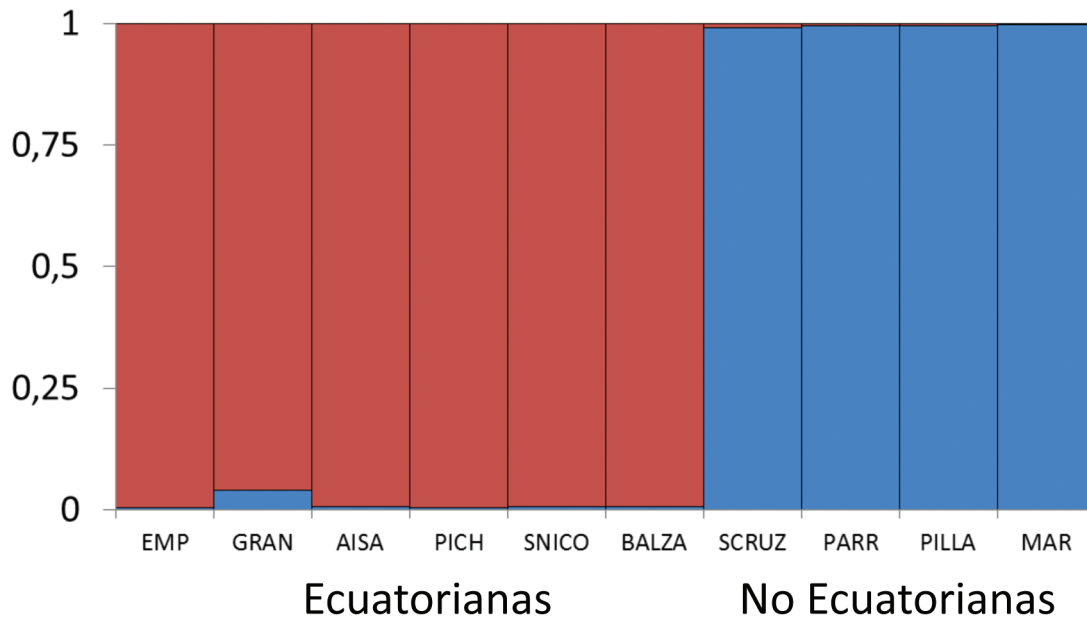


Figura 3. Estructura de poblaciones de *Tectona grandis* L. f. del Ecuador de acuerdo con el análisis de conglomerados con enfoque Bayesiano (K = 2).

Figure 3. Structure of the *Tectona grandis* L. f. populations of Ecuador according to the Bayesian cluster analysis (K = 2).



DISCUSIÓN

La extracción del ADN de plantas que contienen grandes cantidades de polifenoles, taninos y polisacáridos es complicada (Webb y Knapp, 1990; Varadarajan y Prakash, 1991). En el caso de *T. grandis*, así como en otras especies maderables, existen altas concentraciones de metabolitos secundarios, tales como polifenoles y taninos, que inhiben la acción enzimática de polimerasas y endonucleasas de restricción, mismas que son fundamentales en los procesos de digestión y amplificación por PCR (Collins y Symons, 1992; Nieto - Rodríguez *et al.*, 2005). Para desarrollar estrategias de genotipificación como los RAPD o el empleo de cualquier otro tipo de marcadores moleculares, es necesario contar con ADN de buena calidad que se recolecte de hojas maduras, debido a que las más jóvenes contienen concentraciones superiores de compuestos que dificultan la extracción, mientras que las de mayor edad presentan tejidos lignificados (Matthew *et al.*, 1998). La concentración del ADN fue muy alta, por lo cual se diluyó para optimizar el proceso de amplificación. Ferreira y Grattapaglia (1998) sostienen que en el análisis RAPD uno de los factores clave es justamente este, puesto que, cuando la cantidad es muy alta, la lectura de bandas en el gel no es muy clara; por otro lado, si esta es inferior, se ocasiona la pérdida de bandas importantes.

La elección de RAPD como estrategia de análisis genético se hizo porque son marcadores moleculares apropiados para el estudio de especies en las cuales se desconoce su secuencia genómica, aparte de ser una técnica de fácil implementación que permite la detección correcta de la diversidad genética en especies forestales, tales como *Pinus muricata* D. Don. (Wu *et al.*, 1999), *Pilocarpus microphyllus* Stapf. (Moura *et al.*, 2005), *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. (Luna - Rodríguez *et al.*, 2005) y *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007), en comparación con otras técnicas de genotipificación más complejas como los AFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados) y los SSR (microsatélites). Los RAPD fueron muy eficientes para detectar la variación de las accesiones analizadas, con los que se obtuvieron valores de diversidad HT ≥ 0.70 , que son mayores a los registrados en *P. sylvestris* L. (<0.37) (Szmidi *et al.*, 1996) y *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl. (<0.40) (Díaz *et al.*, 2001). En 15 poblaciones de *S. parahybum*, especie maderable nativa del Ecuador, se utilizaron diez oligonucleótidos RAPD de las series OPA y OPC y se obtuvieron de 12 a 16 productos amplificados por oligonucleótido, porcentajes de polimorfismo de 95 % y HT = 0.87 (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007). El alto valor de HT en este trabajo evidencia la constante recombinación genética natural que presenta *Tectona grandis* en Ecuador y que responde a factores bióticos y abióticos que inciden en la reproducción y diseminación de su semilla, incluido el hombre.

A pesar de que la teca es una especie exótica en Ecuador, se infiere que, con base en los resultados, la población que

and Knapp, 1990; Varadarajan and Prakash, 1991). There are in *T. grandis*, as in other timber-yielding species, high concentrations of secondary metabolites such as polyphenols and tannins; these inhibit the enzymatic action of polymerases and restriction endonucleases, which are essential for the digestion and for PCR amplification (Collins and Symons, 1992; Nieto - Rodríguez *et al.*, 2005). In order to develop genotyping strategies such as the use of RAPDs or of any other molecular markers, it is necessary to collect a good quality DNA from ripe leaves, as the younger leaves contain higher concentrations of compounds that make the extraction difficult, while older leaves have lignified tissues (Matthew *et al.*, 1998). The DNA concentration was very high and was therefore diluted in order to optimize the amplification process. Ferreira and Grattapaglia (1998) hold that this is a key factor in the RAPD analysis, for, when DNA concentrations are very high, the reading of bands in the gel is not very clear; on the other hand, low concentrations result in the loss of significant bands.

RAPDs were chosen as a genetic analysis strategy because they are molecular markers that are suitable to study species whose genomic sequence is unknown, and because this technique is easy to implement and allows the correct detection of genetic diversity in forest species like *Pinus muricata* D. Don. (Wu *et al.*, 1999), *Pilocarpus microphyllus* Stapf. (Moura *et al.*, 2005), *Pinus patula* Schiede ex Schltdl. et Cham. (Luna - Rodríguez *et al.*, 2005) and *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007), compared to other, more complex genotyping techniques, such as AFLP (amplified fragment length polymorphisms) and the SSR (microsatellites). The RAPDs were very effective for detecting the variations of the analyzed accessions, through which diversity values of $H_t \geq 0.70$ were obtained; these values are higher than those registered for *P. sylvestris* L. (<0.37) (Szmidi *et al.*, 1996) and *P. oocarpa* Schiede ex Schltdl. (<0.40) (Díaz *et al.*, 2001). In 15 populations of *S. parahybum* -a timber-yielding species native to Ecuador-, ten RAPD oligonucleotides of the OPA and OPC series were utilized, and 10 to 16 amplified products were obtained for each oligonucleotide, as well as polymorphism percentages of 95 % and an H_t value of 0.87 (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007). The high H_t value in this work evinces the ongoing natural genetic recombination presented by *Tectona grandis* in Ecuador and is due to both biotic and abiotic factors that have an impact on the reproduction and dissemination of its seed, including humankind.

Although teak is an exotic species in Ecuador, based on the results, it is inferred that the population of Pichilingue (introduced from India) was the origin of the rest of the analyzed Ecuadorian germplasm. The genetic distances between the populations were relatively low and were grouped according to their origin, given the high degree of kinship between the studied individuals, a similar case to that of *Quercus acutissima* Carruth. cited by Chung *et al.* (2004). The Ecuadorian germplasm was

originó al resto del germoplasma ecuatoriano analizado fue Pichilingue (India). Las distancias genéticas entre las poblaciones fueron relativamente bajas y se agruparon de acuerdo con su origen, lo que obedece al gran parentesco de los individuos estudiados, similar a lo citado por Chung *et al.* (2004) en *Quercus acutissima* Carruth.. El germoplasma ecuatoriano se dividió en dos subgrupos, uno con las accesiones más antiguas (≥ 40 años) y genéticamente más diversas del INIAP-Pichilingue y Granada; y otro que incluyó poblaciones de Alba Isabel, El Empalme, Balzar y San Nicolás, poblaciones más recientes (≥ 25 años) y que se corroboró, son menos variables. El bajo nivel de diversidad en las poblaciones jóvenes de teca se asocia con el origen limitado del germoplasma del cual proceden, pues en este caso se utilizaron árboles con características fenotípicas superiores pero con estrecho parentesco entre sí. A partir de lo anterior se considera a Pichilingue y a Granada como los dos probables sitios de plantación inicial de teca en Ecuador, de donde posteriormente ocurrió la dispersión de la especie como cultivo comercial al resto del país.

Las locaciones de teca con fuente de semilla de Honduras y Costa Rica mostraron los niveles de diversidad genética más altos, lo cual sugiere que la variación en Ecuador también se ha enriquecido con la introducción de germoplasma nuevo. Las diferencias significativas entre los grupos considerados (ecuatorianos y no ecuatorianos) el AMOVA corrobora la variación genética significativa, producto de un origen geográfico distinto, por el alto grado de diferenciación genética. Estudios realizados en diferentes especies forestales como *Cedrela odorata* L. y *Pinus oocarpa* muestran que, por lo general, existe una relación directa entre las distancias geográficas y las genéticas de las poblaciones (Parker y Hamrick, 1996; Parker *et al.*, 1997).

Este trabajo ofrece resultados similares a los observados en otro taxón de importancia para Ecuador en el que se analizó la diversidad genética y las relaciones entre su germoplasma, el "pachaco" (*Schizolobium parahybum*), especie exótica que se adaptó a las condiciones ambientales del país, y en la que se generó diversidad, producto de la polinización libre entre árboles dispersos (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007). La reproducción sexual ha favorecido cierta variabilidad genética que los silvicultores ecuatorianos han aprovechado de acuerdo con sus intereses, o bien, la selección natural privilegió la predominancia de los mejores individuos (Tipan, 1982). Una demanda importante y constante es la disponibilidad de semilla de plantas superiores para el establecimiento de las nuevas plantaciones forestales. Sin embargo, en general, se produce o se dispone de poca información sobre la naturaleza genética, origen o historia de la semilla para utilizarse en dichas plantaciones (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007).



divided into two subgroups, one with older (≥ 40 years) and more genetically diverse accessions from INIAP-Pichilingue and Granada, and another including populations from Alba Isabel, El Empalme, Balzar y San Nicolás, which are more recent (≥ 25 years) and were proven to be less variable. The low level of diversity in the young teak populations is associated to the limited origin of the germplasm from which they are derived, for in this case trees utilized had superior phenotypic characteristics but also a close kinship between them. Based on this, Pichilingue and Granada are considered to be the two sites where teak was initially planted in Ecuador, from which the species was subsequently spread to the rest of the country as a commercial crop.

The locations of teak with a seed source from Honduras and Costa Rica showed the highest levels of genetic diversity; this suggests that the variation in Ecuador has also been enriched by the introduction of the new germplasm. The significant differences between the two groups considered in the AMOVA (Ecuadorian and non-Ecuadorian) corroborate the significant genetic variation -occurring as a result of their different geographic origins- based on the high degree of genetic differentiation. Studies of various forest species such as *Cedrela odorata* L. and *Pinus oocarpa* show that, in general, there is a direct relationship between the geographic and the genetic distances between populations (Parker and Hamrick, 1996; Parker *et al.*, 1997).

This study offers similar results to those observed in another important forest taxon in Ecuador, the "tower tree" (*Schizolobium parahybum*), whose genetic diversity and relationships between the germplasm of an exotic species adapted to the environmental conditions of the country were analyzed, and which generated a particular diversity due to the free pollination between scattered trees (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007). The sexual reproduction has favored a certain genetic variability from which Ecuadorian forestry experts have profited according to their interests, or whose best individuals have been privileged and rendered predominant by natural selection (Tipan, 1982). There is a major ongoing demand for the availability of seeds of superior plants for the establishment of new forest plantations. However, little information about the genetic nature, origin or history of the seeds that will be used in these plantations is produced or available (Canchignia - Martínez *et al.*, 2007).

CONCLUSIONS

There is a significant genetic differentiation between the seed sources for *T. grandis* from Ecuador and those from other countries. The Ecuadorian germplasm is genetically more diverse.

The commercial teak plantations of the Ecuadorian coastline are probably originated from the seeds produced by the introduction of this species in Pichilingue (INIAP) and Granada. The germplasm of

CONCLUSIONES

Existe diferenciación genética significativa entre fuentes de semilla de *T. grandis* de Ecuador y las provenientes del extranjero. El germoplasma ecuatoriano es genéticamente más diverso.

Es probable que las plantaciones comerciales de teca del Litoral Ecuatoriano provengan de semilla producida por las introducciones de Pichilingue (INIAP) y Granada. Las plantaciones jóvenes establecidas con semillas de Honduras y Costa Rica son diferentes al germoplasma que ya existía en el país.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo económico de éste trabajo por parte del Dr. E. Motte y de la Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador. S. Hernández-Delgado y N. Mayek-Pérez son becarios del Sistema Nacional de Investigadores y de los programas de estímulos al desempeño de los investigadores (EDI) y becas de exclusividad (COFAA) del Instituto Politécnico Nacional.

REFERENCIAS

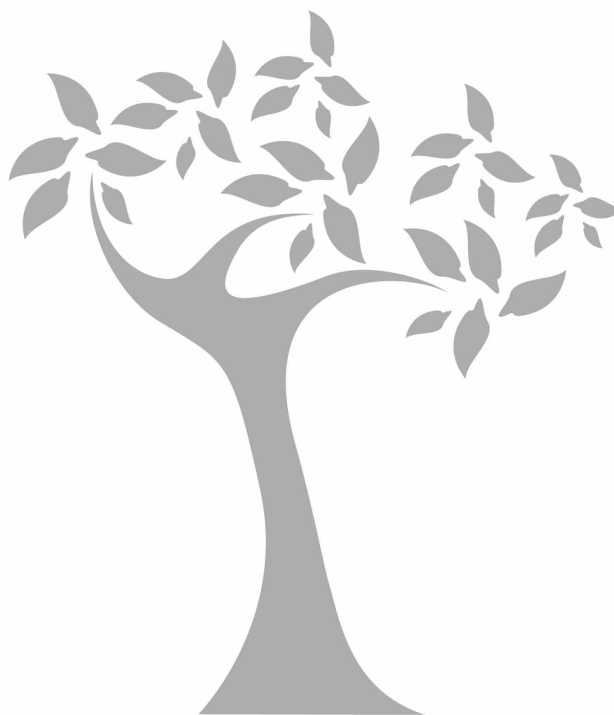
- Ahuja, M. R. 2001. Recent advances in molecular genetics of forest trees. *Euphytica* (121): 173-195.
- Canchignia - Martínez, H. F., S. Hernández-Delgado, M. González - Paz, E. Motte and N. Mayek - Pérez. 2007. Genetic relationships among *Schizolobium parahybum* (Vell.) Blake (Leguminosae) ecotypes from Ecuador and other countries. *Silv. Genet.* (56): 214-22.
- Centeno J., C. 1997. The management of teak plantations. Mérida, Venezuela. www.tremail.nl/teakscan.dal/files/mngteak.htm. (12 de febrero de 2009).
- Collins, G. G. and R. H. Symons. 1992. Extraction of nuclear DNA from grape vine leaves by a modified procedure. *Plant Mol. Biol. Rep.* (10): 233 - 235.
- Chung, M. Y., M. G. Chung, E. R. Myers, J. M. Chung, K. J. Kim, C. W. Park, B. Y. Sun and J. H. Park. 2004. Spatial genetic structure in distributed populations of *Quercus acutissima* (Fagaceae). *Silv. Genet.* (53): 206 - 211
- Dalmau, K. P., S. J. Gallardo B. e I. Rivadeneira. 2004. Proyecto del cultivo de la teca, como alternativa de forestación e inversión a largo plazo. Escuela Superior Politécnica del Litoral. Guayaquil. Ecuador. <http://www.dspace.espol.edu.ec/bitstream/123456789/648/1/1195.pdf> (22 de octubre de 2009).
- Dellaporta, S. J., J. Wood and J. V. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep. *Version II. Plant Mol. Biol. Rep.* (1): 19 - 21.
- Díaz V., L. M. Muñoz and E. Ferrer. 2001. Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaragua populations of *Pinus oocarpa*. *Mol. Ecol.* (10): 2593 - 2603.
- Doyle J. J. and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* (19): 11-15.
- Dunsdon, A. J., and A. J. Simons. 1996. Provenance and progeny trials. In: J. L. Stewart, G. E. Allison, and A. J. Simons (eds). *Gliricidia sepium*. Genetic Resources for Farmers. Oxford Forestry Institute, University of Oxford. Oxford, UK. 125 p.
- Earl, D. A. and B. M. vonHoldt. 2012. Structure Harvester: a website and program for visualizing structure output and implementing the Evanno method. *Cons. Genet. Resour.* (4): 359 - 361.
- Evanno, G., S. Regnaut and J. Goudet. 2005 Detecting the number of clusters of individuals using the software Structure: a simulation study. *Mol. Ecol.* (14): 2611 - 2620.
- Excoffier, L., G. Laval and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* (1): 47 - 50.

the young plantations established with seeds from Honduras and Costa Rica is different from that which existed before in the country.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors wish to express their gratitude for the financial support provided for this study by Ph.D. E. Motte and Quevedo State Technical University, Ecuador (Universidad Técnica Estatal de Quevedo, UTEQ) in Ecuador. S. Hernández-Delgado and N. Mayek-Pérez are grantees of the National System of Researchers and of the research promotion programs (EDI) and hold exclusivity grants (COFAA) from the National Polytechnic Institute (Instituto Politécnico Nacional).

End of the English version



- Felsenstein, J. 1989. PHYLIP manual, version 3.2. University of California Herbarium, Berkeley, CA. USA. s/p.
- Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 3ª ed. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, Brasil. 218 p.
- Gupta, P. K., A. L. Nadgir, A. F. Mascarenhas and V. Jaganthan. 1980. Tissue culture of forest trees: clonal multiplication of *Tectona grandis* L. (teak) by tissue culture. *Plant Sci. Lett.* (17): 259 - 268.
- Hampl, V., A. Pavlíček and J. Flegr. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting - based phylogenetic trees with the freeware program Freetree: Application to *Trichomonad* parasites. *Int. J. Syst. Ecol. Microbiol.* (51): 731 - 735.
- Hartmann, H. T., T. E. Kester and F. T. Davies. 1990. *Plant propagation: principles and practices*. 5th ed. Prentice and Hall. Englewood Cliffs, NJ. USA. 647 p.
- Huff, D., R. Peakall and E. Smouse. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss [*Buchoe dayloides* (Nutt.) Engelm]. *Theor. Appl. Genet.* (86): 927 - 934.
- Luna-Rodríguez, M., J. López-Upton and L. Iglesias-Andreu. 2005. Morphometric and molecular (RAPD) variability in a plantation of *Pinus patula* in Veracruz, México. *Agrociencia* (39): 231 - 235.
- Matthew, D., M. Davey, J. Brian, K. Lowe, F. Bligh, S. Roach and C. Jones. 1998. DNA isolation and AFLP genetic fingerprinting of *Theobroma cacao* (L.). *Plant Mol. Biol. Rep.* (16): 49 - 59.
- Moura E. F., J. P. Pinto, J. B. Santos and O. A. Almeida. 2005. Genetic diversity in a jaborandi (*Pilocarpus micrphyllus* Stapf.) germplasm bank assessed by RAPD markers. *Rev. Bras. Plantas Medicinai* (7): 1-8.
- Neale, D. and R. Sederoff. 1991. Paternal inheritance of chloroplast DNA and maternal inheritance of mitochondrial DNA in loblolly pine. *Theor. Appl. Genet.* (77): 212 - 216.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* (89): 583 - 590.
- Nei, M. and S. Kumar. 2000. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford. UK. pp. 77-183.
- Nei, M. and W. H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (76): 5269 - 5273.
- Nieto-Rodríguez, J. E., L. Ramos y E. Motte. 2005. Extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis* L. para su empleo en la técnica RAPD. *Foresta Veracruzana* (7): 1 - 6.
- Nieto-Rodríguez, J. E., S. Hernández-Delgado and N. Mayek-Pérez. 2013. Morphological and genetic analysis of *Triplaris guayaquilensis* Wedd (Polygonaceae): one native tree from Ecuador. *Ciencia Forestal* (23): 415 - 423.
- Page, R. D. M. 2000. *Tree View*. Division of Environmental and Evolutionary Biology, Institute of Biomedical and Life Sciences. University of Glasgow. Glasgow, Scotland. <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html> (12 de septiembre de 2009).
- Parker, K. and A. Hamrick. 1996. Genetic variation in sand pine (*Pinus clausa*). *Canadian J. For. Res.* (26): 244-254.
- Parker, A., A. Hamrick and E. Stacy. 1997. Allozyme diversity in *Pinus virginiana* (Pinaceae): Intraspecific and interspecific comparisons. *Amer. J. Bot.* (84): 1372 - 1382.
- Pritchard, J. K. and X. Wen. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* (155): 945 - 959.
- Pritchard, J. K., X. Wen and D. Falush. 2010. Documentation for structure software: version 2.3. University of Chicago. Chicago, IL. USA. 38 p.
- Ramos, L. 2000. Algunos avances en la morfogénesis de la teca (*Tectona grandis* L.). Tesis de Maestría en Ciencias. Universidad de Ciego de Ávila. Ciego de Ávila, Cuba. 55 p.
- Schneider, S., J. M. Kueffer, D. Roessli and L. Excoffier. 1997. Arlequin version 1.1: A software for population genetic data analysis. *Genetics and Biometry Laboratory*. University of Geneva. Geneva, Switzerland. s/p.
- Skroch, P., J. Tivang and J. Nienhuis. 1992. Analysis of genetic relationships using RAPD markers data. In: *Crop Science Society of America* (ed.). *Applications of RAPD technology to plant breeding*. Madison, WI. USA. pp. 26 - 29.
- Szmidt, A., X. Wang and M. Lu. 1996. Empirical assessment of allozyme and RAPD variation in *Pinus sylvestris* (L.) using haploid tissue analysis. *Heredity* (76): 412 - 420.
- Tipan, G. 1982. El Pachaco. Centro Forestal Conocoto del INIAP. Quito, Ecuador. 18 p.
- Uyemoto, J. K., Y. P. Zhang and B. C. Kirkpatrick. 1998. A small-scale procedure for extracting nucleic acids from woody plants infected with various phytopathogens for PCR assay. *J. Virol. Meth.* (23): 312 - 316.
- Varadarajan, G. S. and C. S. Prakash. 1991. A rapid and efficient method for the extraction of total DNA from the sweet potato and its related species. *Plant Mol. Biol. Rep.* (9): 6 - 12.
- Webb, D. M. and S. J. Knapp. 1990. DNA extraction from a previously recalcitrant plant genus. *Plant Mol. Biol. Rep.* (8): 180 - 185.
- Williams, J. G. K., K. Livak, J. Rafalski and S. Tingey. 1990. DNA polymorphic amplified by arbitrary primers is useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.* (18): 341 - 345.
- Wu, J., K. Krutovski and S. H. Strauss. 1999. Nuclear DNA diversity population differentiation and phylogenetic relationships in the California close - cone pines based on RAPD and allozyme markers. *Genome* (42): 893 - 908.

