

## VARIABILIDAD Y DIFERENCIACIÓN GENÉTICA EN CUATRO POBLACIONES DE LA PLANTA MEDICINAL *Psychotria acuminata* EN COSTA RICA<sup>1/ 2/</sup>

Alfonso Lara\*, Roberto Valverde<sup>3/\*</sup>, Oscar Rocha\*\*, Luis Gómez\*.

**Palabras clave:** *Psychotria acuminata*, planta medicinal, diversidad genética, RAPD, ISSR.

**Key words:** *Psychotria acuminata*, medicinal plant, genetic diversity, RAPD, ISSR.

### RESUMEN

Un total de 51 accesiones de *Psychotria acuminata*, provenientes de 4 poblaciones en Costa Rica, fueron evaluadas con los marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) e ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat DNA). Con el uso de 16 decámeros se obtuvo 70 loci polimórficos y con 3 ISSRs 15 loci polimórficos. Ambos tipos de imprimador fueron capaces de determinar la diversidad genética entre las 4 poblaciones. Los dendrogramas basados en la distancia genética entre las poblaciones no mostraron similitud entre los RAPDs y los ISSRs; sin embargo, ambos métodos revelaron una alta variabilidad genética entre las poblaciones ( $G_{st}$  de 0,292 y 0,313 para los RAPDs y los ISSRs, respectivamente). Estos niveles altos de diversidad genética, entre las 4 poblaciones, no pudieron ser explicados por los factores climáticos ( $r^2=-0,302$ ,  $P=0,560$ ) ni por las distancias geográficas ( $r^2=-0,183$ ,  $P=0,768$ ). Con los resultados obtenidos se concluye que las poblaciones de *P. acuminata* evaluadas presentan un importante nivel de diferenciación genotípica. Como consecuencia, sería posible utilizar la diversidad genética de esta especie no solo en programas de conservación de la biodiversidad, sino también para un mejor uso de sus recursos fitoquímicos.

1/ Recibido para publicación el 25 de noviembre del 2002.

2/ Este trabajo es parte de la tesis de M.Sc. del primer autor. Programa de Estudios de Posgrado en Biología, Universidad de Costa Rica.

3/ Autor para correspondencia. Correo electrónico: robertov@cariari.ucr.ac.cr

### ABSTRACT

**Genetic diversity and differentiation of four populations of the medicinal plant *Psychotria acuminata* in Costa Rica.** Fifty-one *Psychotria acuminata* accessions from 4 populations in Costa Rica were evaluated for genetic diversity using random amplified polymorphic DNA (RAPD) primers and inter-simple sequence repeat DNA (ISSR) primers. With the use of 16 10-mer primers, 70 polymorphic DNA loci were produced. On the other hand, with the 3 different ISSR primers, 15 polymorphic loci were generated. Both primer types were able to determine the genetic diversity among the 4 populations. Dendrograms based on the genetic distances among the 4 populations did not show similarities between RAPDs and ISSRs. However, both methods showed high genetic diversity among populations based on their  $G_{st}$  (0.292 and 0.313, respectively). Those high levels of genetic diversity, among the 4 populations, could be explained neither by the climate factor ( $r^2=-0.302$ , P-value 0.560) nor by the geographic distance ( $r^2=-0.183$ , P-value 0.768). From present data it is concluded that the *P. acuminata* populations evaluated here show an important level of genotype differentiation. As a consequence, it may be possible to utilize the genetic diversity of the species not only for biodiversity conservation programs, but also for a better use of their phytochemical resources.

\* Centro de Investigaciones Agronómicas, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

\*\* Escuela de Biología, Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica.

## INTRODUCCIÓN

*Psychotria acuminata*, pertenece a la familia Rubiaceae y se ubica en el género *Psychotria*, el cual comprende aproximadamente 1650 especies de plantas a nivel mundial (Hamilton 1989). Las plantas de *P. acuminata* son arbustos de entre 1-3 m de altura, muy ramificados, de hojas glabras, las flores son pequeñas, blancas o amarillo pálido y los frutos son lisos, hemiesféricos y de color entre azul y púrpura. Habitan en bosques lluviosos siempre verdes, de tierras bajas sobre las 2 vertientes, Pacífica y Caribeña de Costa Rica y pueden ser localizadas desde los 0 hasta los 1000 msnm (Burger 1993).

*Psychotria acuminata* es una planta medicinal que se encuentra aún en estado no domesticado. El interés medicinal y comercial en esta planta radica en la presencia de los alcaloides derivados de isoquinolina emetina y cefalina en sus raíces, además de otros compuestos de interés científico presentes en esta especie (Itoh *et al.* 1999, Solís *et al.* 1993, Glinski *et al.* 1995, Teshima *et al.* 1990). Estos alcaloides son utilizados como expectorantes y eméticos en casos de envenenamiento y para el tratamiento de la disentería amébrica causada por *Entamoeba histolítica* (Skorupa y Assis 1998, Solís *et al.* 1993, Yoshimatsu y Shimomura 1991). Otros alcaloides encontrados son la Psychotrina y su *O*-metil éter, los cuales son inhibidores selectivos de la transcriptasa reversa I del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (Tan *et al.* 1991).

El estudio de plantas medicinales *i.e.* *Psychotria acuminata*, es un objetivo prioritario en zonas de alta diversidad biológica como los bosques tropicales de Costa Rica. La importancia de las investigaciones sobre la variabilidad genética de las especies, radica en el impacto que pueden tener sus compuestos derivados, una vez que éstas sean domesticadas y los métodos de extracción estandarizados, y por contribuir a la preservación de los bosques donde habitan.

El conocimiento de la variabilidad genética de plantas con uso medicinal, al igual que plantas utilizadas con otros fines, permitiría realizar un mejor aprovechamiento de los recursos fitogenéticos (Palevitch 1991). Skorupa y Assis (1998) reconocen la importancia de los estudios sobre la variabilidad genética de poblaciones naturales y los

factores que influyen en la productividad de los metabolitos de *P. ipecacuanha*, una especie relacionada. Así mismo, advierten sobre la falta de investigaciones que permitirían determinar los genotipos de plantas con mayor potencial para la producción de compuestos de interés, tales como los alcaloides ya mencionados. En este sentido ya se han realizado trabajos para determinar los niveles de variación genética en *P. ipecacuanha* (Martins *et al.* 2000, Skorupa y Assis 1998).

Para determinar los niveles de variación genética entre organismos de una especie o entre diferentes niveles taxonómicos, se puede utilizar varios métodos de caracterización (Morell *et al.* 1995). Los marcadores moleculares generados por los RAPD (Random Amplified Polymorphisms DNA, en inglés) (Antoni 1997), y los generados por los ISSR (Simple Sequence Repeats, en inglés), conocidos también como SSR, STR o microsátélites (Vogel y Scolnik 1997), presentan ventajas comparativas respecto a métodos tales como RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms, en inglés). Para la obtención de los RAPDs y los ISSRs no se requiere de un conocimiento previo de la secuencia del ADN en estudio; ninguno de los 2 métodos utiliza sondas radioactivas; son relativamente rápidos; emplean bajas cantidades de ADN y generan numerosos polimorfismos distinguibles (Karp y Edwards 1997).

Los RAPDs son fragmentos amplificados con el uso de oligonucleótidos sintéticos cortos ( $\pm 10$  bases, decámeros), con una secuencia aleatoria, que evalúan el ADN total por medio de la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la detección de polimorfismos. Por su parte los ISSR utilizan, igualmente, la técnica PCR; sin embargo, éstos tienen la capacidad de detectar diferencias aún entre individuos muy cercanos (Fang y Roose 1997). Los imprimadores del método ISSR son oligonucleótidos compuestos de una secuencia corta repetida, *i.e.* (GATA)<sub>n</sub> y en algunas ocasiones estos poseen entre 1-4 nucleótidos anclados en uno de los extremos (ASSR). Tanto las secuencias repetidas como los nucleótidos anclados son seleccionados aleatoriamente. Una característica de este método es que debido a la naturaleza de los imprimadores, estos solamente detectan variaciones en regiones que coincidan con el imprimador, las cuales son regiones no codificantes;

muy abundantes en el genoma tanto de plantas como de animales y que además presentan una alta tasa de mutación (Ciofi *et al.* 1998). Conocidas las bondades de estos 2 tipos de marcador molecular, el objetivo de este trabajo fue determinar los niveles de variación y diferenciación genética de *Psychotria acuminata* de 4 localidades de Costa Rica por medio de RAPDs y de ISSRs.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se colectó hojas de un total de 51 accesiones de *Psychotria acuminata*, procedentes de 4 localidades de Costa Rica (Figura 1):

- La Cruz se ubica en la provincia de Guanacaste, al N-NE del Volcán Orosi, cerca de la Estación de Pitilla 11° 01' 00" N y 85° 25' 00" O. Este es un bosque de transición entre seco del Pacífico y bosque húmedo del Atlántico, con una importante influencia climática del Lago de Nicaragua.
- Sarapiquí se ubica en la provincia de Heredia. El sitio de colecta está cerca de la Estación Biológica La Selva 10° 25' 52" N y 84° 00' 13" O, en un pequeño bosque al margen de un riachuelo y rodeado de grandes áreas cultivadas con piña. Aquí se colectó un total de 14 muestras.
- Puriscal se ubica en la provincia de San José. El sitio de colecta está en la localidad de Santa Rosa de Puriscal, en la Reserva Biológica La Cangreja. La zona comprende un bosque primario, en las faldas de la fila de La Cangreja, en las márgenes del Río Negro 9° 42' 52" N y 84° 23' 30" O. Aquí se colectó un total de 12 muestras.
- Golfito se ubica en la provincia de Puntarenas y el sitio de colecta está en el Refugio de Fauna Silvestre Golfito, en la margen de un río en el bosque a 08° 33' 00" N y 83° 06' 00" O. Aquí se colectó un total de 12 muestras.

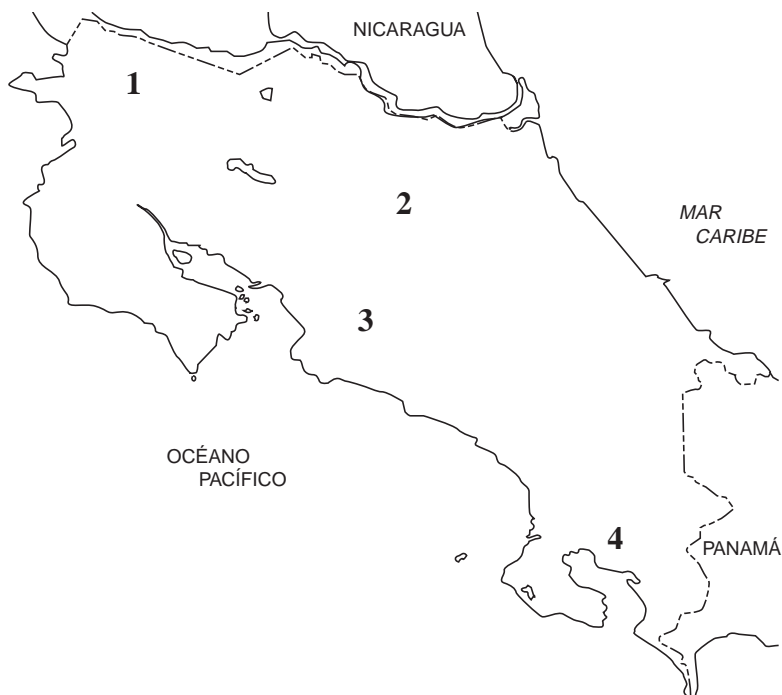


Fig. 1. Ubicación geográfica de los sitios de colecta de *P. acuminata* en Costa Rica. 1-La Cruz, Guanacaste; 2-Sarapiquí, Heredia; 3-Puriscal, San José; y 4-Golfito, Puntarenas.

## Extracción de ADN

El material vegetal fue colectado e inmediatamente almacenado y transportado en nitrógeno líquido hasta el Laboratorio de Biotecnología de Plantas del Centro de Investigaciones Agronómicas de la Universidad de Costa Rica, donde fue almacenado a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Una vez en el laboratorio el tejido foliar fue liofilizado. La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología descrita por Agwanda *et al.* (1997). Para la extracción de ADN se utilizó aproximadamente 100 mg de tejido foliar liofilizado, el cual fue macerado en un mortero con la ayuda de sílice en polvo. Al procedimiento reportado por Agwanda *et al.* (1997), se le adicionó un paso de eliminación de proteínas utilizando para ello fenol:cloroforno:isoamil alcohol (25:24:1). La cuantificación y calidad del ADN se determinó con un espectrofotómetro de luz UV a 260 nm y 280 nm. La concentración final de las muestras se estandarizó a  $25\text{ ng }\mu\text{l}^{-1}$ .

## Reacciones PCR

Las reacciones de amplificación se prepararon de acuerdo con Williams *et al.* (1990) en volúmenes fijos de 25  $\mu\text{l}$ , conteniendo Tris-HCl 10 mM pH 8,3, KCl 50 mM,  $\text{MgCl}_2$  2,5 mM, dNTPs 0,1  $\mu\text{M}$ , imprimador 0,5  $\mu\text{M}$ , 5  $\text{ng }\mu\text{l}^{-1}$  de ADN y 1,25 unidades de *Taq* ADN polimerasa (Promega Co. Ltd.). Los decámeros empleados fueron todos los de la serie OPC (Operon Technologies Inc. Alameda, CA). También se evaluó 4 ISSRs (Inter-Simple Sequence Repeats), identificados como #827 (AC)<sub>8</sub>G, #834 (AG)<sub>8</sub>CTT, #841 (GA)<sub>8</sub>CTC y #857 (AC)<sub>8</sub>CTG; las secuencias de estos imprimadores fueron tomadas de Nagaoka y Ogihara (1997) y los oligos elaborados en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica. Las condiciones de amplificación empleadas, en el termociclador (GeneAmp<sup>®</sup> 9700 de Perkin Elmer), para todas las reacciones con los imprimadores OPC, fueron: una pre-desnaturalización a  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, seguida de 45 ciclos a  $94^{\circ}\text{C}$  por 1 min. (desnaturalización); luego  $36^{\circ}\text{C}$  por 1 min. (hibridación) y

$72^{\circ}\text{C}$  por 1 min. (extensión). También se realizó una extensión final a  $72^{\circ}\text{C}$  por 5 min. Cuando se trabajó con los ISSR, se utilizó una temperatura de  $58^{\circ}\text{C}$  por 1:30 min. en la etapa de hibridación, el resto del procedimiento fue igual al descrito para los decámeros. Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 2% con un buffer de TBE y fueron visualizados con bromuro de etidio ( $0,55\text{ }\mu\text{g ml}^{-1}$ ) en un transiluminador de luz UV. El marcador de peso molecular utilizado fue Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III y los geles fueron fotografiados con una película Polaroid 667.

## Análisis de datos

Los loci encontrados fueron registrados en una matriz binaria de datos como presente (1) y ausente (0). La matriz de distancias genéticas entre poblaciones se estimó con base en Nei (1978). La matriz de distancias genéticas fue analizada por el método unweighted pair-group using arithmetic averages (UPGMA) modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5. El coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ) se calculó como describe Nei (1973). La matriz de distancias genéticas, los dendrogramas y el coeficiente de diversidad genética fueron estimados utilizando el programa de computadora PopGene 32, versión 1.31 (© University of Alberta and Center for International Forestry Research) para marcadores dominantes.

## Datos climáticos y distancias geográficas

Con el fin de determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las 4 poblaciones de *Psychotria acuminata* y las variables climáticas de los sitios donde se ubican las poblaciones, se procedió a coleccionar los datos de promedio anual de: precipitación, precipitaciones máximas y mínimas, temperatura, temperaturas máximas y mínimas, temperaturas promedio en las épocas de mayor y menor precipitación, temperaturas máximas y mínimas en los meses de mayor y menor precipitación, promedio anual de la humedad relativa y

humedad relativa en las épocas de mayor y menor precipitación. El cuadro 1 muestra los datos para algunas de las variables consideradas en este análisis. También, con el fin de evaluar la correlación entre la separación física y las distancias genéticas de las poblaciones de *P. acuminata* se elaboró una matriz de distancias geográficas, utilizando las distancias geográficas lineales entre las 4 poblaciones.

Para evitar una influencia mayor de alguna de las variables climáticas (*i.e.* precipitación) (Cuadro 1) con respecto a las otras variables, se estandarizó los datos para las 4 poblaciones. Los datos geográficos no requirieron estandarización por tratarse de una sola variable. La estandarización de los datos, las distancias euclidianas, y los dendrogramas, fueron realizados utilizando el programa de computadora SYSTAT versión 9, © SPSS Inc., 1998. Con los datos climáticos estandarizados y con las distancias geográficas, se produjo una matriz para

cada variable, considerando las 4 poblaciones y con cada una de éstas se elaboró un dendrograma por el método de UPGMA.

## RESULTADOS

### Amplificaciones

Un total de 20 decámeros y 4 ISSRs fueron evaluados para todas las 51 accesiones. Se excluyó 3 decámeros y 1 de secuencia repetida debido a que no se presentaron amplificaciones o los productos de amplificación fueron ambiguos. Un patrón típico de los RAPDs se observa en la figura 2. Con los decámeros se obtuvo un total de 70 loci polimórficos (95%) y 4 monomórficos, el número de loci por imprimador fue de 1-10 con 5 en promedio. El gran número de polimorfismos observado, produjo una cantidad elevada de diferentes patrones de bandas, a

Cuadro 1. Condiciones climáticas y altura sobre el nivel del mar de los sitios de colecta de muestras de *Psychotria acuminata*.

Sitio	Prec. anual	Temp. máx.	Temp. mín.	Temp. prom.	Hum. prom.	msnm
Puriscal	2524,6	25,4	16	20,7	85 %	400
Sarapiquí	4171,25	30,75	21,64	26,2	95%	50
Guanacaste	2687,52	31,06	21,19	26,13	90%	700
Golfito	4831,5	31,5	21,3	26,4	nd	50

nd = no hubo datos

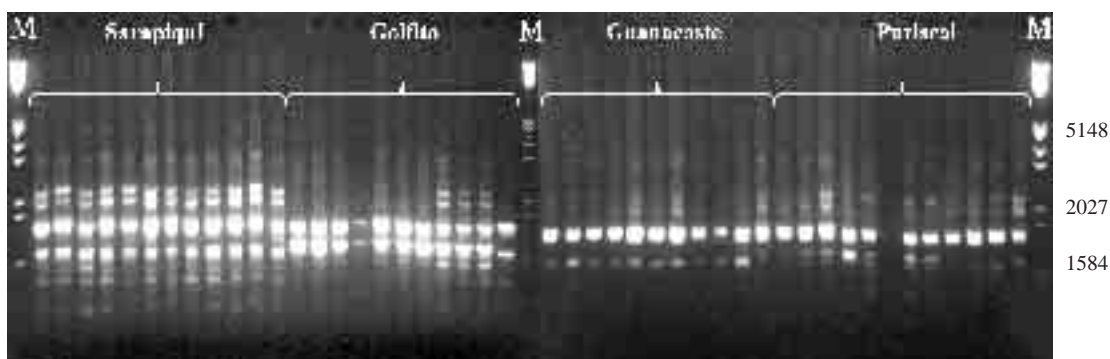


Fig. 2. Productos de amplificación de las 4 poblaciones de *P. acuminata* con el imprimador OPC-20. M=marcador de peso molecular Lambda DNA/EcoR I + Hind III.

través de todas las accesiones evaluadas con cada imprimador del método RAPD (Cuadro 2). El número de patrones fue menor cuando se usó ISSRs (Cuadro 3). Un ejemplo de un patrón usando el método ISSR es mostrado en la (Figura 3). Con este método se obtuvo 15 loci polimórficos (83%) y 3 monomórficos, el número de loci por imprimador fue de 4-9 con un promedio de 6 (Cuadro 3). Con el uso de ambos marcadores el tamaño de los fragmentos amplificados varió entre 100-2000 pb.

### Relación entre poblaciones

El dendrograma construido con los datos generados por los RAPDs, muestra la formación de 2 grupos; Sarapiquí-Puriscal y Golfito-Guanacaste (Figura 4). En la matriz de distancias genéticas (Cuadro 4) se puede observar que las poblaciones que registran una menor distancia genética son Sarapiquí y Puriscal (0,136), por otro lado las poblaciones con la mayor distancia genética son Sarapiquí y Guanacaste (0,262), Golfito se

Cuadro 2. Secuencias de los decámeros (RAPD), con el número total de loci, el número de polimorfismos y el número de patrones producidos.

Imprimador	Secuencia (5' → 3')	Número de loci	Número de polimorfismos	Número de patrones
OPC 01	TTCGAGCCAG	5	5	8
OPC 02	GTGAGGCGTC	10	10	34
OPC 04	CCGCATCTAC	3	3	4
OPC 05	GATGACCGCC	7	6	12
OPC 06	GAACGGACTC	1	1	2
OPC 07	GTCCCGACGA	2	2	3
OPC 08	TGGACCGGTG	5	4	11
OPC 10	TGTCTGGGTG	4	4	12
OPC 11	AAAGCTGCGG	5	4	7
OPC 12	TGTCATCCCC	4	4	5
OPC 14	TGCGTGCTTG	5	5	11
OPC 15	GACGGATCAG	5	5	10
OPC 16	CACACTCCAG	3	2	4
OPC 18	TGAGTGGGTG	4	4	9
OPC 19	GTTGCCAGCC	4	4	5
OPC 20	ACTTCGCCAC	7	7	14
Total		74	70	151
Promedio		4,62	4,38	9,44

Cuadro 3. Secuencia de los imprimadores usados para el análisis con los ISSRs, el número total de bandas, el número de polimorfismos y el número de patrones producidos.

Imprimador	Secuencia (5' → 3')	Número de loci	Número de polimorfismos	Número de patrones
827	(AC) <sub>8</sub> G	9	7	16
841	(GA) <sub>8</sub> CTC	5	4	6
857	(AC) <sub>8</sub> CTG	4	4	4
Total		18	15	26
Promedio		6,0	5	8,67

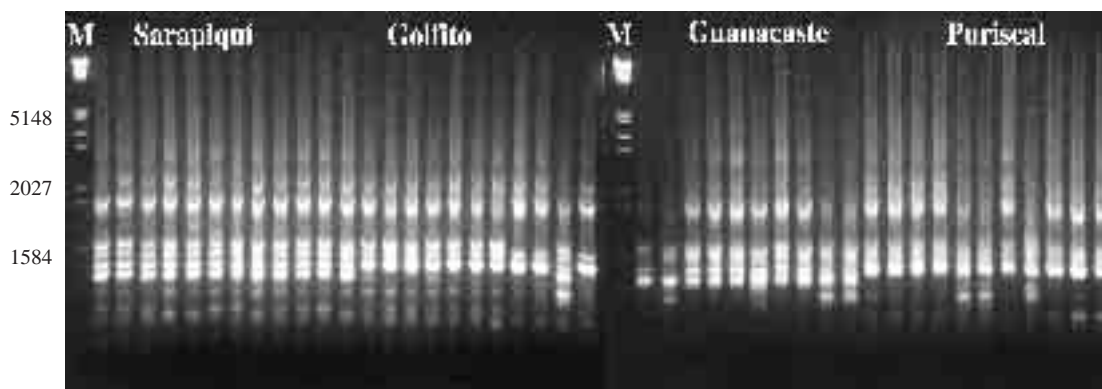


Fig. 3. Productos de amplificación en las 4 poblaciones de *P. acuminata* con el imprimador ISSR-827. M=marcador de peso molecular Lambda DNA/*EcoR* I + *Hind* III.

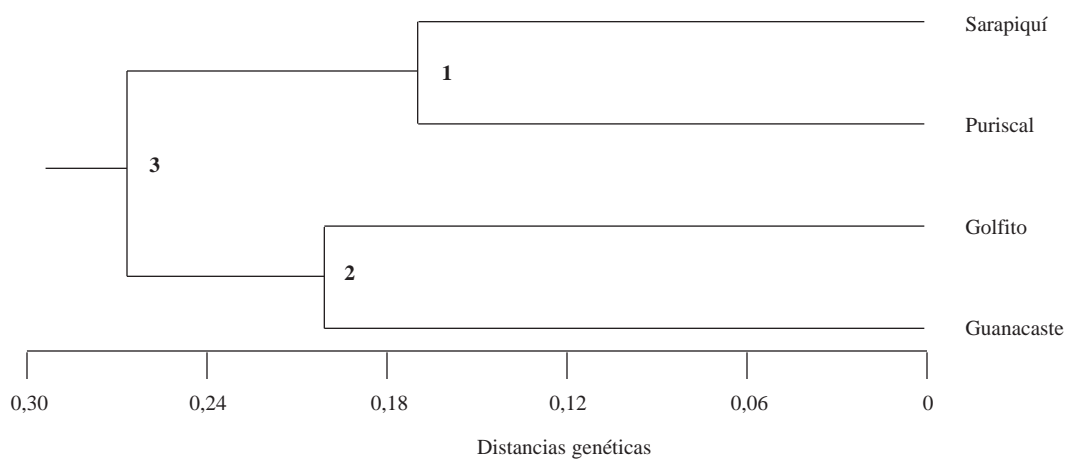


Fig. 4. Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de RAPDs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5

Cuadro 4. Matriz de distancias genéticas de los datos generados por los RAPDs (Nei 1978).

Poblaciones	Sarapiquí	Golfito	Guanacaste	Puriscal
Sarapiquí	0,0			
Golfito	0,177	0,0		
Guanacaste	0,262	0,155	0,0	
Puriscal	0,136	0,167	0,208	0,0



mantiene en una distancia intermedia respecto a las otras poblaciones.

La matriz de distancias genéticas obtenida con la información generada por los ISSRs (Cuadro 5) produjo un dendrograma que muestra, igualmente, la formación de 2 grupos; Sarapiquí-Guanacaste y Golfito-Puriscal (Figura 5). Sin embargo, estos grupos tienen una composición diferente a la que se obtuvo en el dendrograma elaborado con los datos generados por los RAPDs (Figura 4). En la matriz de distancias genéticas generada con los ISSRs se puede observar que las poblaciones que registran una menor distancia genética son Sarapiquí y Guanacaste (0,065), las poblaciones con mayor distancia genética son Guanacaste y Golfito (0,192) y Puriscal mantiene una distancia intermedia con respecto a las otras poblaciones (Cuadro 5).

La determinación del coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ), permitió establecer, con la información generada con los RAPDs, un valor de la  $G_{st}$  de 0,292 mientras que la  $G_{st}$  proveniente de los ISSRs fue de 0,313.

### Relación variabilidad genética y clima

Con el fin de determinar la relación existente entre la variabilidad genética de las 4 poblaciones de *Psychotria acuminata* evaluadas en este estudio y los factores climáticos: precipitación, temperatura y humedad relativa de los sitios donde se ubican las poblaciones, se procedió a elaborar una matriz de distancias euclidianas (datos no mostrados) y con ésta un dendrograma (Figura 6).

Cuadro 5. Matriz de distancias genéticas de los datos generados por los ISSRs (Nei 1978).

Poblaciones	Sarapiquí	Golfito	Guanacaste	Puriscal
Sarapiquí	0,0			
Golfito	0,111	0,0		
Guanacaste	0,065	0,192	0,0	
Puriscal	0,168	0,130	0,096	0,0

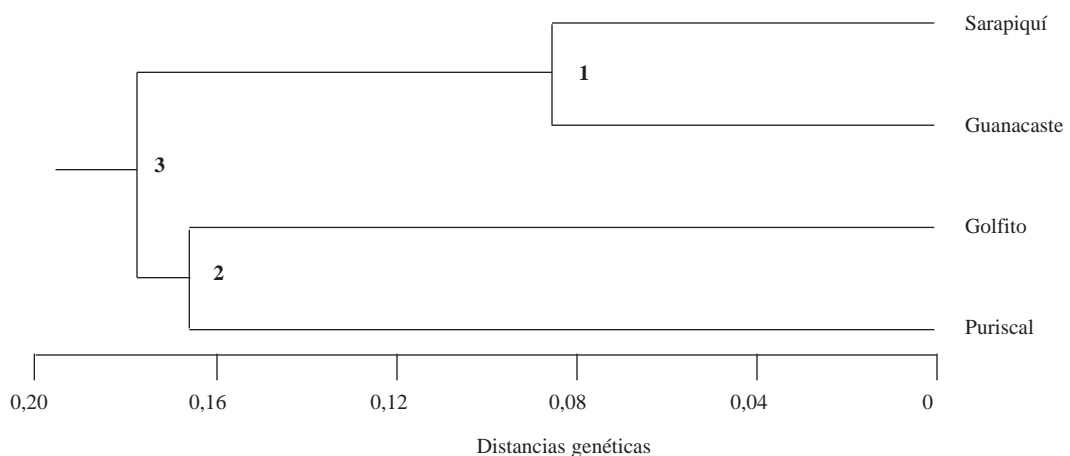


Fig. 5. Dendrograma generado con las distancias genéticas de Nei (1978), obtenidas a partir de ISSRs. Método UPGMA modificado del procedimiento NEIGHBOR de PHYLIP Versión 3.5



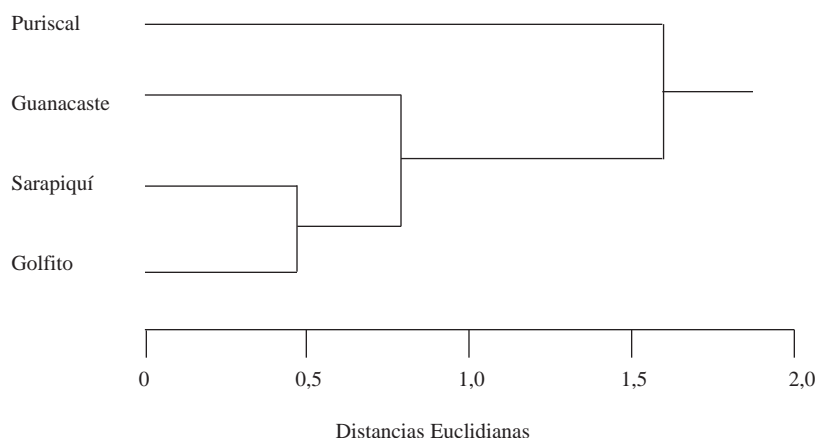


Fig. 6. Dendrograma generado a partir de los datos climáticos: temperatura, humedad relativa y precipitación para cada una de las 4 localidades.

El dendrograma generado a partir de los datos climáticos revela la mayor afinidad climática entre los sitios de Sarapiquí y Golfito, a este grupo se une por afinidad Guanacaste y finalmente Puriscal. Al comparar este dendrograma con el generado a partir de la matriz de distancias genéticas de los RAPDs (Figura 4), se puede notar una clara diferencia, donde el grupo de mayor afinidad climática Sarapiquí y Golfito no corresponde con el grupo de menor distancia genética Sarapiquí y Puriscal. La evaluación de ambas matrices confirma la falta de correlación entre los 2 dendrogramas ( $r^2=-0,302$ ) ( $P=0,560$ ).

Comparando el dendrograma de distancias genéticas generado con los ISSRs (Figura 5) con el dendrograma para los datos climáticos, se puede apreciar, al igual que con el método de RAPDs, que no existe semejanza entre ellos y

la correlación entre ambas matrices no es significativa ( $r^2=-0,350$ ) ( $P=0,563$ ). En este caso el grupo de menor distancia genética está formado por las poblaciones de Sarapiquí y Guanacaste, lo cual no concuerda con los sitios climáticos más afines.

### Relación distancias genéticas y geográficas

Con el fin de correlacionar las separaciones físicas y las distancias genéticas de las poblaciones de *P. acuminata*, se elaboró una matriz utilizando las distancias geográficas lineales entre las 4 poblaciones (Cuadro 6).

Al comparar el dendrograma de distancias genéticas de los RAPDs (Figura 4) y el producido con las distancias geográficas (Figura 7), se observa que las poblaciones con menor separación

Cuadro 6. Matriz de distancias euclidianas basada en las distancias geográficas lineales entre los sitios donde se ubican las poblaciones.

Sitios	Puriscal	Golfito	Sarapiquí	Guanacaste
Puriscal	0,0			
Golfito	191687,7	0,0		
Sarapiquí	90024,3	230541,7	0,0	
Guanacaste	182651,2	372888,3	167582,7	0,0

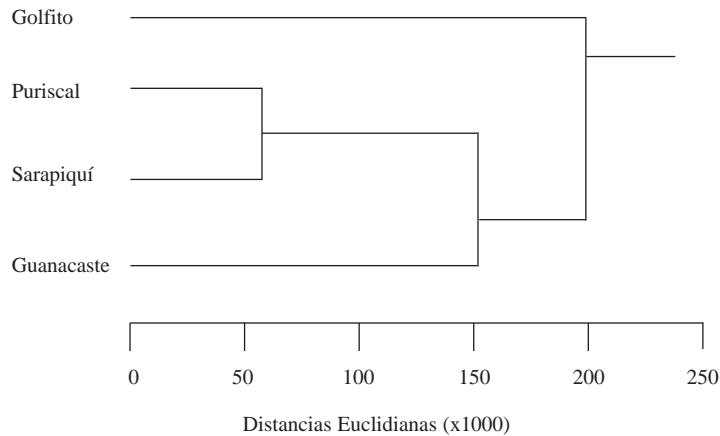


Fig. 7. Dendrograma generado a partir de las distancias geográficas entre las 4 localidades.

física coinciden con las poblaciones de menor distancia genética (Sarapiquí y Puriscal); sin embargo las poblaciones de Guanacaste y Golfito poseen la segunda menor distancia genética pero, la distancia geográfica entre ambas poblaciones es la mayor de todas. La correlación entre ambas matrices, a pesar de alguna similitud no es significativa ( $r^2=-0,648$ ) ( $P=0,237$ ).

El dendrograma de las distancias genéticas de los ISSRs presenta alguna similitud con el dendrograma de distancias geográficas. La mayor distancia geográfica, como se mencionó anteriormente, es entre las poblaciones de Guanacaste y Golfito, lo cual coincide con la mayor distancia genética para este caso; sin embargo, la menor distancia genética se registró entre 2 poblaciones con una distancia geográfica intermedia. La correlación entre ambas matrices es igualmente no significativa ( $r^2=-0,183$ ) ( $P=0,768$ ).

## DISCUSIÓN

### Amplificaciones

El uso de marcadores moleculares, como los RAPDs y los ISSRs, para caracterizar especies vegetales, que no se puede o resulta difícil separar mediante el uso de marcadores morfológicos,

ha resultado una herramienta muy útil por su facilidad de uso, repetitibilidad, ausencia de elementos radiactivos durante el análisis y la gran cantidad de polimorfismos que se obtiene, en comparación con RFLPs o isoenzimas (Irwin *et al.* 1998). En este estudio, la fidelidad de los marcadores utilizados se comprobó al no encontrar variaciones en el análisis de los loci provenientes de PCRs y extracciones de ADN repetidas, datos que son coincidentes con lo reportado por Prevost y Wilkinson (1999), Anthony *et al.* (2001), Irwin *et al.* (1998) y Coletta *et al.* (1998).

Estas características hacen que los RAPDs sean actualmente usados de manera más común por los fitomejoradores de plantas para identificar la variación genética de variedades silvestres, variedades comerciales y accesiones de una especie determinada (Anthony *et al.* 2001, Morell *et al.* 1995, Forapani *et al.* 1999). En adición a las bondades de estos marcadores, ya mencionadas, su desempeño como generadores de gran cantidad de polimorfismos, en este trabajo, ha sido muy aceptable. Más aún, en el caso de los RAPDs fue posible identificar una cantidad respetable de loci considerados como muy informativos (Cuadro 2). Nuevamente, estos datos son concordantes con lo reportado por Irwin *et al.* (1998), Coletta-Filho *et al.* (1998), Anthony *et al.* (2001), Le Corre *et al.* (1997).

## Relación entre poblaciones

En términos de capacidad para determinar la variabilidad genética entre las 4 poblaciones costarricenses de *Psychotria acuminata*, se realizó 3 tipos de evaluación: matrices de distancias genéticas, dendrogramas y un análisis de la proporción de la variabilidad ( $G_{st}$ ).

Las matrices mostraron la distancia genética que existe entre las 4 poblaciones. Los dendrogramas, basados en las matrices de datos, señalan una alta variabilidad genética entre las poblaciones y permiten la agrupación de las mismas. Por su parte la  $G_{st}$  indicó la proporción de la diferenciación genética entre las poblaciones. La  $G_{st}$  determinada tanto con los RAPDs como por los ISSRs fue en promedio 30,3%; este resultado indica niveles muy altos de diferenciación genética entre los 4 grupos en evaluación, si se considera que en promedio la diversidad entre poblaciones de plantas es de un 22,4% ( $G_{st}=0,224$ ) (Hamrick y Godt 1989).

En el caso del presente trabajo, la  $G_{st}$  promedio para RAPDs e ISSRs fue de 30,3%, proveniente de una  $G_{st}=0,292$  para los RAPDs y una  $G_{st}=0,313$  para los ISSRs. Los resultados obtenidos para cada marcador, pueden ser explicados si se toma en cuenta que las diferencias genéticas detectadas por los RAPDs provienen de variaciones en cualquier región del ADN. Donde los imprimadores encuentren una secuencia complementaria; esto incluye regiones codificantes y no-codificantes. Por esta característica de los RAPDs, el panorama bajo el que se evalúan las variaciones del ADN es más amplio que el de las isoenzimas, ya que los patrones generados por las isoenzimas son más representativos de regiones conservadas del genoma. Por otro lado, los ISSRs contrario a las isoenzimas, evalúan las regiones no-codificantes del ADN también denominadas microsátélites. Estas regiones están conformadas por secuencias repetidas de nucleótidos, las cuales presentan diferencias longitudinales y de combinaciones de nucleótidos. Por ser regiones altamente repetitivas, están expuestas a errores frecuentes de replicación, lo que las hace más polimórficas. Bajo éstas consideraciones, una  $G_{st}=30,3\%$  en esta especie, es un indicativo

de una alta variabilidad genética entre las poblaciones en estudio. Un dato adicional que corrobora esta observación acerca de la variabilidad genética de las poblaciones de *Psychotria acuminata* de este estudio, es el hecho de que Bawa y Beach (1983), hayan caracterizado a *P. acuminata* como una especie autógena, ya que Hamrick y Godt (1989) indican que las especies autógenas poseen valores altos de variabilidad genética entre las poblaciones.

Si se observa los dendrogramas de distancia genética, no es muy claro por qué los 2 grupos generados con el uso de RAPDs son diferentes de los 2 grupos generados con los ISSRs. Lo que sí es claro es que con los polimorfismos generados por ambos marcadores, fue posible demostrar en ambos casos, la variabilidad genética presente entre las poblaciones.

## Relación variabilidad genética y clima

Con la determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones en estudio, se inició un proceso de búsqueda de parámetros que permitieran explicar la variabilidad genética observada. Existen trabajos en los cuales la relación genotipo-ambiente ha podido explicar, en un alto porcentaje, la variabilidad genética observada. Muchos autores argumentan que la formación de ecotipos en especies de plantas, ocurre por la adaptación de las poblaciones a condiciones ambientales distintas a las originales. Así, el establecimiento de un grupo de plantas a distintas alturas, condiciones climáticas o de suelo, depende de la capacidad que tenga éste grupo para adaptarse al nuevo ambiente. En este trabajo, bajo las condiciones ambientales estudiadas, no fue posible establecer una relación entre la diversidad genética y el clima de los sitios donde se ubican las poblaciones. Las correlaciones de las distancias genéticas, generadas por los RAPDs y los ISSRs, con los datos de clima de las diferentes poblaciones, fueron negativas, lo que indica que la variabilidad genética obtenida no se puede explicar por efecto de las condiciones climáticas. Posiblemente, si el estudio se hubiera realizado para evaluar una característica morfológica, la influencia de uno o varios de los factores climáticos

evaluados hubiese mostrado una correlación positiva alta, debido a un mayor efecto ambiental o de adaptabilidad (Nevo *et al.* 1986, Palevitch 1991, Vargas *et al.* 2001).

### Relación distancias genéticas y geográficas

Las distancias genéticas obtenidas en la matriz respectiva (Cuadros 4 y 5) indican la variabilidad existente entre las 4 poblaciones objetivo de este estudio. Como el origen de dicha variabilidad es desconocido y no pudo ser explicado por los factores climáticos asociados a cada una de las regiones donde se encuentran las poblaciones en estudio, se procedió a realizar un análisis de correlación entre las distancias genéticas entre poblaciones y las distancias geográficas. Este método ha sido utilizado por diferentes investigadores (Rocha y Lobo 1996, Murillo y Rocha 1999). En el presente trabajo, las correlaciones arrojaron un resultado negativo para ambos análisis (RAPDs e ISSRs), lo que indica que estadísticamente no hay relación entre las variables evaluadas. Sin embargo, los dendrogramas construidos con las distancias geográficas entre las poblaciones, mostraron alguna relación entre ambos factores, lamentablemente no se obtuvo concordancia entre los resultados. En teoría, la información obtenida de la relación entre las distancias genética y geográfica, lo que indica es una relación directamente proporcional, donde entre más corta es la distancia geográfica entre 2 grupos menor será la variabilidad genética; en contraste, entre mayor es la distancia geográfica mayor será la distancia genética. En algunos casos esta regla se ha cumplido. Rocha y Lobo (1996) en su trabajo con *Enterolobium cyclocarpum* encontraron que poblaciones muy distantes genéticamente, también fueron distantes geográficamente; de la misma manera, algunas poblaciones muy cercanas geográficamente también fueron cercanas genéticamente. Sin embargo, esta relación se apartó de lo esperado cuando 2 poblaciones muy cercanas genéticamente no resultaron tan cercanas geográficamente. Contrario a esto, Le Corre *et al.* (1997) encontraron una correlación positiva entre las distancias genéticas y geográficas en un trabajo realizado con *Quercus petraea*.

Nuestras observaciones respecto a la variabilidad genética de *P. acuminata* en 4 poblaciones de Costa Rica, indican que realmente las 4 poblaciones en estudio son genéticamente diferentes, esto se pudo determinar con el uso de los marcadores moleculares RAPD e ISSR. La variación genética encontrada no se pudo explicar con base en correlaciones entre las distancias genéticas y variaciones climáticas o las distancias geográficas. Sin embargo, la aplicación del índice de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{st}$ ) permitió evidenciar que un 30,3% del total de la variabilidad observada se da entre las poblaciones, lo que implica que el restante 69,7% de la variación genética ocurre dentro de cada población.

La determinación de la variabilidad genética entre las poblaciones estudiadas tiene diferentes implicaciones, una con respecto a la conservación de la variabilidad genética de ésta especie, donde los estudios realizados, permitan detener o prevenir la destrucción de la naturaleza y otra de orden práctico, que debe ser considerada a la hora de iniciar la utilización de esta planta con fines medicinales. Pues al ser los individuos de las 4 poblaciones diferentes, tanto el tipo como la concentración de los alcaloides podría variar. Por tal motivo, el estudio que realiza el Centro de Investigación en Productos Naturales de la Universidad de Costa Rica, sobre los principios químicos de las plantas de estas 4 poblaciones, es de vital importancia para determinar la relación entre la cantidad, tipo y calidad de estos principios químicos con la estructura genética de las 4 poblaciones estudiadas. Así como para generar información en este campo, pues tal y como lo indican Shorupa y Assis (1998), no existen muchas técnicas relacionadas con la potencial variabilidad genética de poblaciones naturales y los factores ambientales que influyen la productividad de los metabolitos durante el cultivo.

El presente trabajo representa un avance tecnológico de gran importancia para la conservación y uso de *Psychotria acuminata*, y se espera que los resultados obtenidos sirvan para evitar algunos de los problemas que demanda una población humana en crecimiento, tal y como lo menciona Trewavas (2001).

## LITERATURA CITADA

- AGWANDA C.O., LASHERMES P., TROUSLOT P., COMBES M.-C., CHARRIER A. 1997. Identification of RAPD markers for resistance to coffee berry disease, *Colletotrichum kahawae*, in arabica coffee. *Euphytica* 97: 241-248.
- ANTHONY F., BERTRAND B., QUIROS O., WILCHES A., LASHERMES P., BERTHAUD J., CHARRIER A. 2001. Genetic diversity of wild coffee (*Coffea arabica* L.) using molecular markers. *Euphytica* 118: 53-65.
- ANTONI J. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *In*: DNA markers: protocols, applications, and overviews. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. 364 p.
- BAWA K.S., BEACH J.H. 1983. Self-incompatibility system in the rubiaceae of a tropical lowland wet forest. *Amer. J. Bot.* 70 (9): 1282-1288.
- BURGER W. 1993. Fieldiana botany flora costarricensis: Fam. Rubiaceae. N° 33, p. 232.
- CIOFI C., FUNK S.M., COOTE T., CHEESMAN D.J., HAMMOND R.L., SACCHERI I.J., BRUFORD M.W. 1998. Genotyping with microsatellite markers. *In*: Molecular tools for screening biodiversity. Ed by Karp A., Issac P.G., Ingram D. S. by Chapman & Hall. London. p. 201-204.
- COLETTA-FILHO H.D., MACHADO M.A., TARGON M.L.P.N., MOREIRA M.C.P.Q.D.G., POMPEU J. 1998. Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers. *Euphytica* 102: 133-139.
- FANG D.Q., ROOSE M.L. 1997. Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers. *Theor. appl. Genet.* 95: 408-417.
- FORAPANI S., CARBONI A., CASTELLANI E., MANDOLINO G., RANALLI P. 1999. RAPD markers for potato germplasm characterization. *J. Genet. & Breed.* 53: 143-147.
- PITNER P., PAV S., ARVIGO R., BALICK M. J., PANTI E., GROB P.M. 1995. Inactivation of cell surface receptors by pheophorbide "a", a green pigment isolated from *Psychotria acuminata*. *Photochemistry and Photobiology* 62 (4): 144-50.
- HAMILTON C.W. 1989. Variations on a ditilous theme in Mesoamerican *Psychotria* Subgenus *Psychotria* (Rubiaceae). *Memoirs of the New York Botanical Garden* 55: 62-75.
- HAMRICK J.L., GODT M.J.W. 1989. Allozyme diversity in plant species. *In*: Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Ed. by Brown H.D., Clegg M.T., Kahler A.L., Weir B.S. Sinauer Associates. EE.UU. 449 p.
- IRWIN S.V., KAUFUSI P., BANKS K., de la PEÑA R., CHO J.J. 1998. Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. *Euphytica* 99: 183-189.
- ITOH A., IKUTA Y., BABA Y., TANAHASHI T., NAGAKURA N. 1999. Ipecac alkaloids from *Cephaelis acuminata*. *Phytochemistry* 52: 1169-1176.
- KARPA., EDWARDS K. 1997. DNA markers: a global overview. *In*: DNA markers: protocols, applications, and overviews. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. p. 1-13.
- Le CORRE V., DUMOLIN-LAPÈGUE S., KREMER A. 1997. Genetic variation at allozyme and RAPD loci in sessile oak *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.: the role of history and geography. *Molecular Ecology* 6: 519-529.
- MARTINS E., OLIVEIRA L., GARCIA R., BARROS W., PEREIRA M., VIEIRA I., PEREIRA T. 2000. Conservation genetics of native populations of *Psychotria ipecacuanha* from south-eastern Brazil. International Conference on Science and Technology for Managing Plant. Genetic Diversity in the 21<sup>st</sup> Century. K.L. Hilton International Kuala Lumpur, Malaysia. p. 69.
- MORELL M.K., PEAKALL R., APPELS R., PRESTON L.R., LLOYD H.L. 1995. DNA profiling techniques for plant variety identification. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 35:807-819.
- 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(4):739-753.
- NAGAOKA T., OGIHARA Y. 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 94: 597-602.
- NEI M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.
- NEI M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

- NEVO E., ZOHARY D., BEILES A., KAPLAN D., STORCH N. 1986. Genetic diversity and environmental associations of wild barley, *Hordeum spontaneum*, in Turkey. *Genetica* 68: 203-213.
- PALEVITCH, D. 1991. Agronomy applied to medicinal plant conservation. *In: The conservation of medicinal plants*. Ed. by Akerele O., Heywood V., Synge H. Cambridge University Press. Cambridge. p. 167-178.
- PREVOST A., WILKINSON M.J. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107-112.
- ROCHA O.J., LOBO J.A. 1996. Genetic variation and differentiation among five populations of the Guanacaste tree (*Enterolobium cyclocarpum* Jacq.) in Costa Rica. *Int. J. Plant Sci.* 157 (2): 234-239.
- SKORUPA L.A., ASSIS M.C. 1998. Collecting and conserving Ipecac (*Psychotria ipecacuanha*, Rubiaceae) germplasm in Brazil. *Economic Botany* 52 (2): 209-210.
- SOLÍS P.N., WRIGHT C.W., GRUPTA M.P., PHILLIPSON J.D. 1993. Alkaloids from *Cephaelis dichroa*. *Phytochemistry* 33 (5): 1117-1119.
- TAN G., KINFHORN A.D., HUGHES S.H., PEZZUTO J.M. 1991. Psychotrine and its O-metil ether are selective inhibitors of human immunodeficiency Virus-1 Reverse transcriptase. *The Journal of Biological Chemistry* 226 (35): 23529-23536.
- TESHIMA D., SUZUKI A., OTSUBO K., HIGUCHI S., AOYAMA T., SHIMOZONO Y., SAITA M., NODA K. 1990. Efficacy of emetic and united state pharmacopoeia Ipecac Syrup in prevention of drug absorption. *Cham. Pharm. Bull.* 38 (8): 2242-2245.
- TREWAVAS A.J. 2001. The population/biodiversity paradox. Agricultural efficiency to save wilderness. *Plant Physiology* 125: 174-179.
- VARGAS E.M., MACAYA G., BAUDOIN J.P., ROCHA O.J. 2001. Case studies on breeding systems and its consequences for germplasm conservation: 3. Electrophoretic mobility of phaseolins in wild populations of Lima beans (*Phaseolus lunatus* L.) in the Central Valley of Costa Rica. *Genetic Resources and Crop Evolution* 48: 109-120.
- VOGEL J.M., SCOLNIK P.A. 1997. Direct amplification from microsatellites: detection of simple sequence repeat-based polymorphisms without cloning. *In: DNA markers: protocols, applications, and overviews*. Ed by Caetano-Anollés G., Gresshoff P.M. New York. 364 p.
- WILLIAMS J.G.K.; KUBELIK A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI J. A.; TINGEY S. V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acid. Res.* 18: 6531-6535.
- YOSHIMATSU K., SHIMOMURA K. 1991. Efficient shoot formation on internodal segments and alkaloid formation in the regenerates of *Cephaelis ipecacuanha* (A. Richard). *Plant Cell Reports* 9: 567-570.