

Optimización de un protocolo de extracción de ADN genómico para *Pinus tecunumanii*

David A. Cerda-Granados* y Verónica Díaz**

Recibido: octubre de 2012 / Aceptado: marzo de 2013

Se optimizó un protocolo para la extracción de ADN genómico de *Pinus tecunumanii* basado en el método de extracción de Doyle y Doyle (1990). Se probaron los megagametofitos de las semillas de árboles de *P. tecunumanii* muestreados en cinco poblaciones naturales de Nicaragua. El método consta de maceración del tejido en tubos Eppendorf, una extracción con bromuro trimetil amonio de cetilo (CTAB) empleando altas concentraciones de sales, proteinasa K, extracciones sucesivas con cloroformo-álcohol isoamílico y un tratamiento con ARNasa A. El rendimiento fue aproximadamente 13 µg de ADN por 58.7 mg de tejido inicial fresco. El ADN genómico obtenido por este método fue apropiado para ser usado en reacciones RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar).

Palabras clave: extracción de ADN / *Pinus tecunumanii* / RAPD / PCR

1. Introducción

Pinus tecunumanii Eguiluz & J. P. Perry (Pinaceae) es una especie de pino del grupo de pinos de cono cerrado, nativa de México y Centroamérica y a menudo usada en plantaciones forestales en el hemisferio sur (Leibing, van Zonneveld, Jarvis & Dvorak, 2009). Aproximadamente 10,000 ha de *P. tecunumanii* están siendo actualmente usadas en plantaciones forestales (Dvorak et al., 2000). Esta especie

* Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León). Frente a la Iglesia La Merced, León, Nicaragua. Tel. 23115013 ext. 1500. Correo electrónico: david.cerda@ct.unanleon.edu.ni, david.cerda@fulbrightmail.org

** Laboratorio de Genética Molecular (GM), Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua, León (UNAN-León). Correo electrónico: veronikadiazni@yahoo.es

es especialmente importante en tierras de altas elevaciones en Colombia y está ganando significancia en el norte de Mozambique como especie pura. En Sudáfrica se está usando en híbridos en combinación con *P. patula* debido a sus favorables propiedades de crecimiento y su resistencia al chancro del pino (*Fusarium circinatum*) de moderada a alta (Dvorak et al., 2000; Kanzler, Payn & Nel, 2012).

El rango actual conocido de *P. tecunumanii* se extiende desde una latitud de 17°02N en Chiapas, México hasta una latitud de 12°42N en el centro de Nicaragua (Dvorak, 2002; Dvorak et al., 2000). Esta especie puede ser agrupada en dos ecotipos basados en evaluaciones con marcadores moleculares (Dvorak, Potter, Hipkins & Hodge, 2009) y ligeras diferencias morfológicas y de adaptabilidad: un ecotipo de altas elevaciones (AE) encontrado desde aproximadamente 1500 a 2900 m de altitud y un ecotipo de bajas elevaciones (BE) que ocurre en altitudes de entre 450 y 1500 m (Dvorak, 1986). Nicaragua tiene seis poblaciones de BE que fueron colectadas por la Cooperativa Internacional para el Mejoramiento y Conservación de Árboles (CAMCORE) y una población de AE fue identificada pero no colectada (Dvorak et al., 2000). Las poblaciones nicaragüenses de BE son muy importantes tanto genética como económicamente, hecho que ha sido evidente en ensayos internacionales de procedencia, como los llevados a cabo por el Instituto Forestal de Oxford (OFI) en 1990 (Gibson, 1994) y por CAMCORE (Dvorak et al., 2000; Dvorak, Hodge & Romero, 2001; Hodge & Dvorak, 1999), donde las poblaciones nicaragüenses de Yúcul, Las Camelias, San Rafael del Norte y Apante fueron sobresalientes en productividad y forma del fuste.

En los últimos años las poblaciones naturales de *P. tecunumanii* de Nicaragua han sido seriamente afectadas por actividades humanas extensivas, desastres naturales (huracán Mitch en 1998), incendios y plagas como *Dendroctonus frontalis* - gorgojo descortezador en 1998-2001 (Comisión Sectorial de Medio Ambiente, 2001). Como consecuencia, los tamaños de las poblaciones de esta especie han sido drásticamente reducidos y se considera que también su diversidad genética. Esto constituye una seria amenaza a su capacidad de adaptación a los cambios ambientales a mediano y largo plazo y, por lo tanto, al desarrollo de estos bosques. Por esta razón se necesitan estrategias correctas para el uso sostenible, conservación y reforestación. Para ello se requiere conocer las estructuras poblacionales y la diversidad genética de la especie en el país. Esto se logra llevando a cabo análisis moleculares con técnicas basadas en el ADN.

Las técnicas moleculares requieren el aislamiento de ADN genómico de pureza apropiada para la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) y digestión enzimática (Katterman & Shattuck, 1983; Peterson, Boehm & Stack, 1997). El crecimiento del número de protocolos de extracción de ADN para especies de plantas específicas sugiere que la extracción de ADN no es siempre simple y los protocolos publicados no son necesariamente reproducibles para todas las especies (Porebski, Bailey & Baum, 1997). El problema a menudo encontrado durante la extracción de ADN es separar el ADN de los contaminantes que existen naturalmente en la célula de la planta, tales como polisacáridos y compuestos fenólicos (Pandey, Adams & Flournoy, 1996; Porebski et al., 1997). Estos compuestos en sus formas oxidadas se enlazan covalentemente a los ácidos nucleicos durante la extracción y los inutilizan para la mayoría de las aplicaciones en investigación (Katterman & Shattuck, 1983;

Peterson et al., 1997). Los polisacáridos son visualmente evidentes en extracciones de ADN por su textura viscosa, como de goma, y hacen que el ADN sea no manejable en el pipeteo y no amplificable en el PCR debido a la inhibición de la *Taq* ADN polimerasa (Fang, Hammar & Grumet, 1992).

Como en muchas otras especies, *Pinus tecunumanii* contiene altos niveles de polisacáridos y fenoles (Stange, Prehn & Arce-Johnson, 1998). Una forma de evitar los problemas con polifenoles es congelar el tejido durante o antes de la homogenización (Katterman & Shattuck, 1983). Alternativamente, el PVP u otros antioxidantes pueden incluirse durante el procedimiento de extracción del ADN (Stange et al., 1998).

Furman, Grattaplagia, Dvorak & O'Malley (1997) extrajeron ADN de *Pinus tecunumanii* y otras especies de pino mediante el uso de un kit comercial. Muchos científicos usan kits comerciales por su facilidad y la buena calidad del ADN extraído, sin embargo, esos kits son costosos. En países en vías de desarrollo, como Nicaragua, trabajar con un protocolo de extracción permite disminuir costos pues se emplean pequeñas cantidades de químicos y pocos equipos. Además, se puede extraer un ADN de muy buena calidad, apropiada para la aplicación de varias técnicas. El presente trabajo surgió debido a que no existe un protocolo publicado que sea específico para la extracción de ADN genómico de *P. tecunumanii*. Es impulsado principalmente por la necesidad de estudiar la condición de las poblaciones naturales de esta especie a nivel genético-molecular.

Con el propósito de aislar ADN de buena calidad de *P. tecunumanii*, se probaron dos métodos de extracción de ADN: un protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990), usado para un sinnúmero de especies vegetales como *Pinus halepensis* (Gómez, Alía & Bueno, 2001) y con algunas modificaciones para *Manguijera indica* (Saldaña & Salazar, 2007), *Pinus canariensis* (Vaxevanidou, González-Martínez, Climent & Gil, 2006), *Chamaecyparis formosensis* y *C. taiwanensis* (Hwang, Lin, Kuo, & Lin, 2001), *Pinus pinaster* (Ribeiro et al., 2002); y otro protocolo descrito por Möller, Bahnweg, Sandermann y Geiger (1992) igualmente usado para la extracción de muchas especies vegetales, como en *Jatropha curcas* (Williams, Ramos & Callejas, 2000) y con algunas modificaciones en *Pachira quinata* (Dolmus, García & Callejas, 2006) y *Cedrela odorata* (Tijerino López, 2009). El protocolo presentado aquí es una modificación del primero, a través del cual obtuvimos un ADN limpio que fue constantemente amplificable por la PCR usando la técnica RAPD (Williams, Kubelik, Livak, Rafalski & Tingey, 1990). Con un ADN de tan buena calidad es posible aplicar varias técnicas moleculares basadas en la PCR, tales como RAPD, microsatélites y SNPs para su uso en estudios a nivel genético. La evaluación de la diversidad genética y la historia evolutiva de la especie, la elaboración de mapas genéticos y la distinción de híbridos con la especie pura son algunas de las varias posibles aplicaciones de dichas técnicas.

2. Materiales y métodos

2.1 Material vegetal

Se recolectaron conos de individuos de *Pinus tecunumanii* correspondientes a cinco poblaciones del norte de Nicaragua: Yúcul, Apante y Monte Carmelo, en Matagalpa; La Brellera, en Jinotega; y San Nicolás, en Estelí. Luego, en el Laboratorio de Genética Molecular de la UNAN-León, se aisló el megagametofito de las semillas (Ilustración 1) y se almacenaron a -20°C para la posterior extracción del ADN genómico.

2.2 Extracción de ADN

Se ensayaron dos protocolos de extracción de ADN en dos individuos por población. El primero, descrito por Doyle y Doyle (1990) y usado para la extracción en tejidos frescos; el segundo protocolo descrito por Möller et al. (1992). Se obtuvo ADN de una mejor calidad y mayor rendimiento con el primer protocolo. Así se eligió el método de Doyle y Doyle (1990) y se añadieron modificaciones (incluidas en el siguiente protocolo) para extraer ADN del total de muestras de *P. tecunumanii* apropiado para la técnica RAPD.

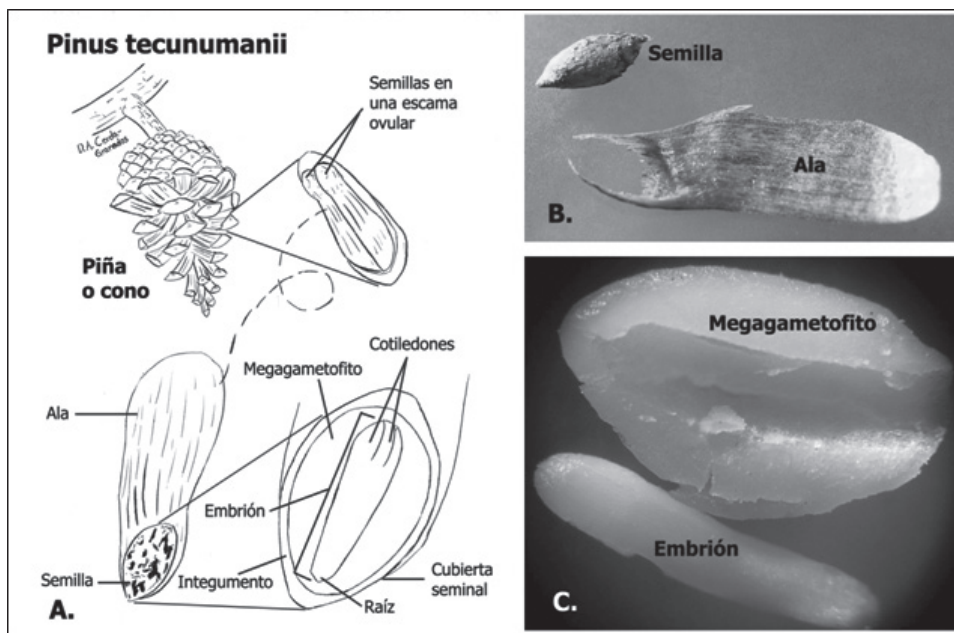


Ilustración 1. Semilla de *Pinus tecunumanii*: A) Representación de la estructura de la semilla de pino (modificado de Curtis y Barnes (2000) para *P. tecunumanii*). B) Foto de la parte externa de la semilla de pino. C) Foto de semilla de pino cortada longitudinalmente por la mitad donde se observa el megagametofito, tejido con el cual se hizo la extracción de ADN.

2.3 Soluciones y reactivos

- Tampón de extracción: 2% CTAB, 100mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 mM EDTA·Na₂·2H₂O, 1.4 M NaCl₂
- β-mercaptoetanol
- 10 mg/ml proteinasa K
- Cloroformo:AIA [24:1 (v/v)]
- Tampón TE: 10 mM Tris-HCl (pH 7.4); 1 mM EDTA·Na₂·2H₂O
- Tampón de lavado: 76% etanol; 10mM acetato de amonio
- 100% isopropanol
- 10mg/ml ARNasa A
- 7.5 M acetato de amonio
- 100% etanol

2.4 Protocolo

1. Macerar 3-5 megagametofitos en 500 µl de tampón de extracción precalentado a 65°C. Al momento de la extracción adicionar 0.2% β mercaptoetanol y 50 µg de proteinasa K. Seguidamente incubar a 60°C por 30 min agitando ocasionalmente.
2. Agregar 1 volumen de cloroformo-AIA (24:1) y mezclar por inversión para formar una emulsión.
3. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4°C.
4. Cuidadosamente trasferir la fase acuosa superior a un tubo nuevo.
5. Repetir pasos 2, 3 y 4.
6. A la fase acuosa ya transferida en un nuevo tubo, adicionar isopropanol frío al 100% (2/3 volúmenes). Mezclar por inversión conservándolo a -20°C por 2 h.
7. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4°C, descartar el isopropanol y lavar el sedimento con 2 ml de tampón de lavado (2 veces) ayudando a resuspender el sedimento con una micropipeta.
8. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4°C después de cada lavado.
9. Eliminar el sobrenadante y dejar secar el precipitado a temperatura ambiente 15-20 min.
10. Resuspender los ácidos nucleicos en 500 µl de tampón TE.
11. Agregar 5 µl de ARNasa A (10µg/ml) e incubar a 37°C por 30 min.
12. Adicionar 7.5 M acetato de amonio (pH 7.7) a una concentración final de 2.5 M y 1 volumen de etanol puro frío. Mezclar muy bien por inversión para precipitar el ADN.
13. Centrifugar a 12000 rpm por 5 min a 4°C, descartar el sobrenadante y dejar secar el ADN a temperatura ambiente unos 30 min, eliminando bien el alcohol.
14. Resuspender a 100 µl de tampón TE y conservar a -20°C.

La calidad del ADN se observó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 0.8%, visualizándose bajo luz UV y fotografiándose con una cámara digital. La concentración y pureza del ADN se determinó a través de un espectrofotómetro Perkin Elmer UV/Vis Lambda. Se midió la densidad óptica (DO) a 260 nm para cuantificar el ADN y se hicieron lecturas a 280 nm para obtener la razón $DO_{260}:DO_{280}$ como un indicador de pureza de ADN (Sambrook & Russell, 2001).

2.5 Amplificación RAPD

La amplificación de fragmentos RAPD fue llevada a cabo de acuerdo a Williams et al. (1990) con algunas modificaciones como reportan Guido y Díaz (2006). El cebador utilizado fue el OPN-09, reportado en el estudio de poblaciones naturales de *Pinus oocarpa* de Nicaragua de Díaz, Muiz y Ferrer (2001) por generar altos niveles de polimorfismo. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Amplitron® II Thermolyne programado con una desnaturalización inicial de 3 min a 92°C, seguido de 45 ciclos que comprenden: una desnaturalización de 30s a 92°C, hibridación de 2 min a 37°C y una elongación de 1 min a 72°C. Luego, una extensión final de 8 min a 72°C.

3. Resultados y discusión

En el presente artículo se describe un eficiente protocolo para la extracción de ADN para *Pinus tecunumanii* basado en el método de extracción CTAB de Doyle y Doyle (1990) para tejidos frescos. Como se mencionó anteriormente, este protocolo es un protocolo destinado a la extracción de ADN de tejido fresco para plantas en general. Por lo que así como es, ha sido utilizado sin ningún problema en varias plantas, como por ejemplo *Pinus pinaster* (Ribeiro et al., 2002). Sin embargo, como todas las especies son diferentes y tienen diferente sustancias químicas y metabolitos, es necesario hacer modificaciones, como fue el caso con *P. tecunumanii*.

Las principales modificaciones que se realizaron incluyen la adición de proteinasa K al homogenizar el tampón de extracción con el tejido, una segunda extracción con Cloroformo:AIA, y una segunda lavada con tampón de lavado. Tales modificaciones hacen que el ADN quede libre de polisacáridos y proteínas, haciendo que el ADN sea de muy buena calidad y más fácil de diluir. Puede verse la calidad del ADN en la Ilustración 2A, donde se observan bandas bien definidas, con muy poco arrastre (el arrastre es un indicador de que el ADN se encuentra degradado). Además, se observa que el ADN obtenido es de alto peso molecular, incluso mayor que el de la primera banda del marcador de peso molecular (10000 pb).

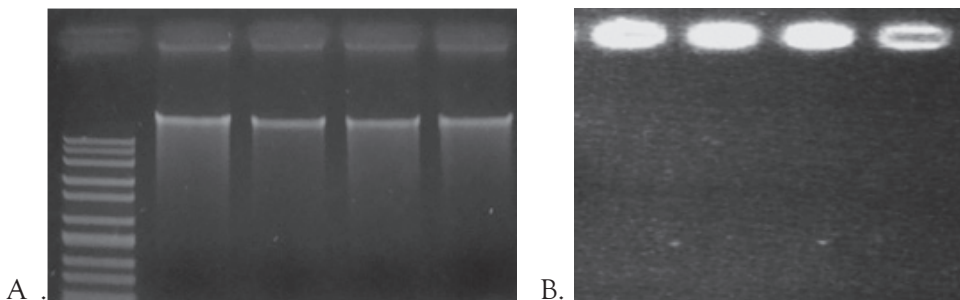


Ilustración 2. Gel de agarosa (0.8%) mostrando ADN genómico de *Pinus tecunumanii* de poblaciones naturales de Nicaragua: A.) ADN extraído con el protocolo optimizado (en el carril 1, Marcador de peso molecular DirectLoad™ Wide Range DNA Marker Sigma®); B.) ADN extraído con el protocolo original de Doyle y Doyle (1990).

Al seguir las indicaciones del protocolo original de Doyle & Doyle (1990) nos encontramos que el ADN tenía una consistencia algo chiclosa y que era difícil de diluir. Además, al hacer el chequeo por electroforesis en gel de agarosa al 0.8 %, el ADN quedaba retenido en los pocillos (véase Ilustración 2B).

El ADN puro tiene una razón ADN/proteína (D_{260}/DO_{280}) de 1.8 (Sambrook & Russell, 2001). Si la razón es mucho menor a este número hay contaminación por proteínas. Si es mayor a 2.0 hay contaminación por ARN. De acuerdo al CIMMYT (2006), en vez de un número hay un rango de 1.8 - 2.0 en el que se cree que la absorción es causada por ácidos nucleicos, aquí se afirma que una relación inferior a 1.8 indica que pueden existir proteínas y/u otros elementos absorbentes de UV en la muestra. En ese caso, es conveniente volver a precipitar el ADN. Una relación superior a 2.0 indica que las muestras pueden estar contaminadas con cloroformo o fenol y se debe volver a efectuar la precipitación con etanol.

Al extraer ADN con el protocolo original se encontró que las muestras tenían contaminación por proteínas o polisacáridos (valores de la razón $DO_{260}:DO_{280}$ fueron inferiores a 1.8) ya que presentaron valores medios de 1.5. Para disminuir la presencia de proteínas en las muestras se agregó proteinasa K al tampón de extracción. La proteinasa K es una poderosa enzima proteolítica con un amplio espectro de acción; es una proteasa molde que bloquea las enzimas degradantes en la lisis de la pared celular y desproteiniza al ADN de forma eficiente (Gross-Bellard, Oudet & Chambon, 1973). También se realizó una segunda extracción con cloroformo:AIA para asegurar la precipitación de las proteínas y la proteinasa K y así obtener los ácidos nucleicos al extraer la fase acuosa. La remoción de proteínas es un paso clave que a menudo es llevado a cabo por la extracción de la fase acuosa de los ácidos nucleicos con fenol y/o cloroformo (Sambrook & Russell, 2001).

Los polisacáridos son contaminantes comunes en el ADN extraído de tejidos vegetales (Demeke & Adams, 1992; Do & Adams, 1991). Los polisacáridos ácidos inhiben la amplificación del ADN, mientras que los denominados polisacáridos neutrales no son inhibitorios (Pandey et al., 1996; Demeke & Adams, 1992). Los polisacáridos son visualmente evidentes en extracciones de ADN por su textura viscosa como de goma y hacen al ADN no manejable en el pipeteo y no amplificable

en el PCR en caso de ser acídicos debido a la inhibición de la *Taq* ADN polimerasa (Fang et al., 1992). Las altas concentraciones de sales y la presencia de CTAB ayudan a la precipitación de los polisacáridos (Kim, Mauthe, Hausner & Klassen, 1990), basados en las diferencias de solubilidad con respecto a los ácidos nucleicos. Como este protocolo ya constaba de altas concentraciones de sales y presencia de CTAB para eliminar los polisacáridos, se dejó un tiempo congelado el tejido previo a la extracción de ADN.

Como algunas muestras tenían razones $DO_{260}:DO_{280}$ mayores a 2.0 se agregó una segunda lavada con el buffer de lavado para eliminar por completo los fenoles que podrían permanecer junto a los ácidos nucleicos.

Con este protocolo se obtuvo aproximadamente 13 μ g de ADN por 58.7 mg de tejido. Esto representa suficiente cantidad de ADN para llevar a cabo alrededor de unas 650 reacciones típicas de la técnica RAPD. El protocolo que se presenta en este artículo es eficiente porque se produce ADN de buena calidad con pocas cantidades de tejido.

Para evaluar si el ADN extraído de *Pinus tecunumanii* es apropiado para usarse en análisis RAPD, se llevaron a cabo amplificaciones RAPD. Las bandas generadas resultaron ser bien definidas y reproducibles (véase Ilustración 3), lo que evidencia el grado de pureza de este ADN, apropiado para el análisis con dicha técnica. Por consiguiente, este ADN tiene la calidad para ser usado en otras técnicas basadas en la PCR como microsatélites y SNPs.

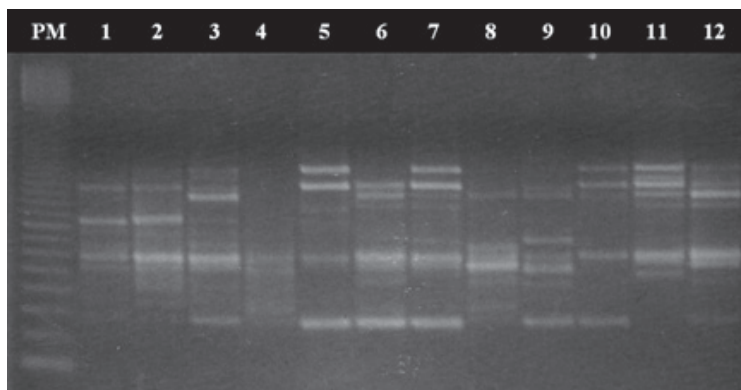


Ilustración 3. Gel de Agarosa al 2% mostrando productos de la técnica RAPD con el cebador OPN-09 en 12 individuos de *Pinus tecunumanii*. Carril PM, Marcador de peso molecular DirectLoad™ Wide Range DNA Marker Sigma®; Carriles 1-12, patrón de banda de 12 individuos de *Pinus tecunumanii* generado por el cebador OPN-09.

4. Agradecimientos

Este trabajo fue elaborado gracias al financiamiento del Programa de Pequeñas Ayudas para la Investigación de la Vice-Rectoría de Investigación y Postgrado de la UNAN-León con fondos ASDI/SAREC.

Referencias bibliográficas

- CIMMYT. (2006). *Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT*. (3ª ed.). México, D.F: CIMMYT.
- Comisión Sectorial de Medio Ambiente. (2001). *Cartera de Perfiles de Proyectos sobre la base del Plan Estratégico para el Manejo del Gorgojo Descortezador (*Dendroctonus frontalis*, Zimm) y Rescate de la Madera de Pino en el Departamento de Nueva Segovia*. Managua: Sistema Nacional de Prevención, Mitigación y Atención a Desastres de la República de Nicaragua.
- Curtis, H. & Barnes, N. S. (2000). *Biología*. 6 ed. Buenos Aires: Editorial Médica Panamericana.
- Demeke, T. & Adams, R. P. (1992). The effect of plant polysaccharides and buffer additives of PCR. *BioTechniques*, (12), 332-334.
- Díaz, V., Muiz, L. M. & Ferrer, E. (2001). Random amplified polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism assessment of genetic variation in Nicaraguan populations of *Pinus oocarpa*. *Mol Ecol*, (10), 2593-2603.
- Do, N. & Adams, R. P. (1991). A simple technique for removing plant polysaccharides contaminants from DNA. *BioTechniques*, (10), 163-166.
- Dolmus, C., García, I. & Callejas, L. (2006). Evaluación de la variabilidad genética en un ensayo de progenies de *Pachira quinata* usando marcadores moleculares. *Encuentro*, (75), 79-88.
- Doyle, J. & Doyle, J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12(1), 13-15.
- Dvorak, W. S. (1986). Provenance/progeny testing of *Pinus tecunumanii*. En: *Proceedings of a joint meeting of IUFRO working parties on breeding theory, progeny testing, seed orchards*. (pp. 299-309). Raleigh, North Carolina: North Carolina State University Cooperative Tree Improvement Program.
- Dvorak, W. S. (2002). *Pinus tecunumanii* Eguiluz & J. P. Perry. En: Vozzo, J. A. (ed). *Tropical Tree Seed Manual*. (pp. 639-642). Washington, D.C.: USDA Forest Service.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R., Gutiérrez, E. A., Osorio, L. F., Malan, F. S. & Stanger, T. K. (2000). *Pinus tecunumanii*. En: CAMCORE (ed.) *Conservation & testing of tropical & subtropical forest tree species by the CAMCORE cooperative*. (pp. 188-209). Raleigh, North Carolina: College of Natural Resources, NCSU.
- Dvorak, W. S., Hodge, G. R. & Romero, J. L. (2001). Resultados de veinte años de investigación sobre el *Pinus tecunumanii* por la Cooperativa de CAMCORE. *Recursos Genéticos Forestales*, (29). Roma: FAO.
- Dvorak, W. S., Potter, K. M., Hipkins, V. D. & Hodge, G. R. (2009). Genetic diversity and gene exchange in *Pinus oocarpa*, a Mesoamerican pine with resistance to the pitch canker fungus (*Fusarium circinatum*). *Int J Plant Sci*, 170(5), 609-626.
- Fang, G., Hammar, S. & Grumet, R. (1992). A quick and inexpensive method for removing polysaccharides from plant genomic DNA. *Biofeedback*, 13(1), 52-54.
- Furman, B. J., Grattapaglia, D., Dvorak, W. S. & O'Malley, M. (1997). Analysis of genetic relationships of Central American and Mexican pines using RAPD markers that distinguish species. *Mol Ecol*, (6), 321-331.

- Gibson, G. L. (1994). Resultados de los Ensayos Internacionales de Procedencias. En: Centro de Mejoramiento Genético y Banco de Semillas Forestales (CMG&BSF) (Eds). *Pinos de Nicaragua*. (pp. 17-27). Managua: Hispamer.
- Gómez, A., Alía, R. & Bueno, M. A. (2001). Genetic diversity of *Pinus halepensis* Mill. Populations detected by RAPD loci. *Ann For Sci*, (58), 869-875.
- Gross-Bellard, M., Oudet, P. & Chambon, P. (1973). Isolation of High-Molecular-Weight DNA from Mammalian Cells. *Eur J Biochem*, (36), 32-38.
- Guido, D. & Díaz, V. (2006). Estudio preliminar de la diversidad genética en procedencias de *Sabal mexicana* de Nicaragua aplicando marcadores moleculares. *Encuentro*, (75), 69-78.
- Hodge, G. R., & Dvorak, W.S. (1999). Genetics parameters and provenance variation of *Pinus tecunumanii* in 78 international trials. *For Genet*, 6(3), 157-180.
- Hwang, S.Y., Lin, H.W., Kuo, Y.S. & Lin, T.P. (2001). RAPD variation in relation to population differentiation of *Chamaecyparis formosensis* and *Chamaecyparis taiwanensis*. *Bot Bull Acad Sinica*, 42(3), 173-179.
- Kanzler, A., Payn, K., & Nel, A. (2012). Performance of two *Pinus patula* hybrids in Southern Africa. *South Forests*, 74(1), 19-25.
- Katterman, F. R. H. & Shattuck, V. I. (1983). An effective method of DNA isolation from the mature leaves of *Gossypium* species that contain large amounts of phenolic terpenoids and tannins. *Prep Biochem*, (13), 347-359.
- Kim, W.K., Mauthe, W., Hausner, G. & Klassen, G.R. (1990). Isolation of high molecular weight DNA and double-stranded RNAs from fungi. *Can J Bot*, (68), 1898-1902.
- Leibing, C., van Zonneveld, M., Jarvis, A. & Dvorak, W. (2009). Adaptation of tropical and subtropical pine plantation forestry to climate change: Realignment of *Pinus patula* and *Pinus tecunumanii* genotypes to 2020 planting site climates. *Scand J Forest Res*, (24), 483-493.
- Möller, E. M., Bahnweg, G., Sandermann, H. & Geiger, H. H. (1992). A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit, bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acid Res*, (20), 6115-6116.
- Pandey, R. N., Adams, R. P. & Flournoy, L. E. (1996). Inhibition of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) by plant polysaccharides. *Plant Mol Biol Rep*, (14), 17-22.
- Peterson, D. G., Boehm, K. S. & Stack, S. M. (1997). Isolation of milligram quantities of nuclear DNA from tomato (*Lycopersicon esculentum*), a plant containing high levels of polyphenolic compounds. *Plant Mol Biol Rep*, 15(2), 148-153.
- Porebski, S., Bailey, L. G. & Baum, B. R. (1997). Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components. *Plant Mol Biol Rep*, 15(1), 8-15.
- Ribeiro, M. M., Mariette, S., Vendramin, G. G., Szmidt, A. E., Plomion, C. & Kremer, A. (2002). Comparison of genetic diversity estimates within and among populations of maritime pine using chloroplast simple-sequence repeat and amplified fragment length polymorphism data *Mol Ecol*, (11), 869-877.
- Saldaña, G. A. & Salazar, E. G. (2007). Aislamiento de ADN de calidad para la amplificación al azar de ADN polimórfico de mango. *Agronomía Trop*, 57(4), 281-286.

- Sambrook, J. & Russell, D. W. (2001). *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. (3^a ed.). Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Stange, C., Prehn, D. & Arce-Johnson, P. (1998). Isolation of *Pinus radiata* Genomic DNA Suitable for RAPD Analysis. *Plant Mol Biol Rep*, (16), 1-8.
- Tijerino López, A. V. (2009). *Determinación de la variabilidad genética en cinco poblaciones naturales de Cedrela odorata L. utilizando la técnica RAPD*. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de Nicaragua-León, León, Nicaragua.
- Vaxevanidou, Z., González-Martínez, S. C., Climent, J. & Gil, L. (2006). Tree populations bordering on extinction: A case study in the endemic Canary Island pine. *Biol Conserv*, (129), 451-460.
- 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. *Nucleic Acid Res*, 18(22), 6531-6535.
- Williams, L. A., Ramos, E. & Callejas, L. (2000). Uso de marcadores RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) para evaluar la variabilidad genética en 7 cultivos de *Jatropha curcas* L. *Encuentro*, (52), 20-29.