



Caracterización molecular y morfológica de progenies de árboles
plus seleccionadas dentro del "Ensayo de procedencias y
progenies de *Cordia alliodora*" de Cenicafé – Colombia.

MARÍA DEL PILAR MÁRQUEZ

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA – PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL
DESARROLLO Y LA CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSTGRADO**



**Programa de enseñanza
Escuela de Postgrado**

**Caracterización molecular y morfológica de progenies de árboles
plus seleccionadas dentro del "Ensayo de procedencias y
progenies de *Cordia alliodora*" de Cenicafé – Colombia.**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Postgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, como requisito parcial para optar por el grado de:

Magíster Scientiae

**Por:
María del Pilar Márquez**



**Turrialba, Costa Rica
2003**

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

FIRMANTES:



Wilbert Phillips, Ph.D.
Consejero Principal

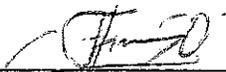


Francisco Mesén, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

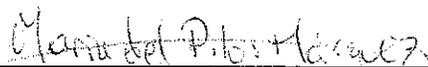


Carlos Astorga, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Marta Leonor Marulanda, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
**Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**



María del Pilar Márquez-Cardona
Candidata

A mis padres...

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor consejero, Wilbert Phillips por su colaboración y apoyo durante estos años.

A los miembros de mi comité asesor, Francisco Mesén y Carlos Astorga, por su gran ayuda.

A Marta Marulanda por su apoyo en la realización de este proyecto, a Carolina Vargas por su amistad y ayuda durante este proceso y a todo el personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira con quienes compartí durante los meses de elaboración de la tesis.

A Carlos Mario Ospina de Cenicafé y todo el equipo de técnicos forestales que me ayudaron en la recolección de los datos en campo.

A mis padres y familia por su apoyo incondicional.

A Cecilia Bruno, Alejandra Arroyo y Fernando Cassanoves por su colaboración en el análisis estadístico.

A la Organización de los Estados Americanos – OEA - por el apoyo financiero para la realización de esta maestría.

TABLA DE CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	<u>1</u>
1.1 Definición del problema.....	<u>2</u>
1.2 Objetivos.....	<u>3</u>
1.2.1 General	<u>3</u>
1.2.2 Específicos	<u>3</u>
1.3 Hipótesis	<u>4</u>
2. REVISIÓN DE LITERATURA	<u>5</u>
2.1 Taxonomía.....	<u>5</u>
2.2 Nombres comunes.....	<u>6</u>
2.3 Distribución geográfica.....	<u>6</u>
2.4 Características de la especie	<u>7</u>
2.5 Descripción botánica.....	<u>7</u>
2.6 Biología reproductiva	<u>8</u>
2.7 Variación fenotípica y genética	<u>9</u>
2.8 Características morfológicas.....	<u>12</u>
2.9 Marcadores moleculares.....	<u>13</u>
2.10 Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	<u>14</u>
2.11 Mejoramiento genético forestal	<u>16</u>
2.12 Análisis Estadístico	<u>20</u>
3. MATERIALES Y METODOS	<u>23</u>
3.1 Localización del estudio.....	<u>23</u>
3.1.1 Selección previa de árboles <i>plus</i>	<u>23</u>
3.1.2 Selección de las accesiones para el estudio	<u>26</u>
3.2 Caracterización morfológica.....	<u>27</u>
3.3 Caracterización molecular.....	<u>27</u>
3.3.1 Material usado	<u>27</u>
3.3.2 Extracción de ADN	<u>28</u>

3.3.3 Cuantificación del ADN	<u>28</u>
3.3.4 AFLPs (Amplified fragment length polymorphisms)	<u>28</u>
3.4 Análisis estadístico	<u>30</u>
3.4.1 Variables analizadas	<u>30</u>
3.4.1.1 Análisis de varianza	<u>30</u>
3.4.1.2 Análisis multivariado	<u>31</u>
3.4.2 Evaluación de datos moleculares	<u>32</u>
4. RESULTADOS	<u>33</u>
4.1 Variación encontrada entre progenies	<u>33</u>
4.1.1 Análisis de varianza	<u>33</u>
4.1.2 Análisis de Componentes Principales	<u>42</u>
4.1.3 Análisis de conglomerados	<u>44</u>
4.2 Caracterización molecular	<u>46</u>
4.2.1 Extracción de ADN	<u>46</u>
4.2.2 Análisis AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) ...	<u>46</u>
4.2.3. Definición de grupos genéticos	<u>49</u>
4.2.3.1 Análisis de conglomerados	<u>49</u>
4.2.3.2 Análisis de Coordenadas Principales y Árbol de Recorrido Mínimo	<u>52</u>
5. DISCUSION	<u>55</u>
6. CONCLUSIONES	<u>63</u>
7. RECOMENDACIONES	<u>65</u>
8. BIBLIOGRAFÍA	<u>66</u>
9. ANEXOS	<u>74</u>
9.1 Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN	<u>76</u>
9.2 Anexo 2. Protocolo para AFLPs en <i>Cordia alliodora</i>	<u>76</u>
9.3 Anexo 3. Preparación del gel de acrilamida	<u>76</u>
9.4 Anexo 4. Matriz de distancias genéticas para datos moleculares, con el índice de Jaccard	<u>80</u>

Márquez, M.P. 2003. Caracterización molecular y morfológica de progenies de árboles *plus* seleccionadas dentro del "Ensayo de procedencias y progenies de *Cordia alliodora*" de Cenicafe – Colombia. Tesis M.Sc. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

RESUMEN

En este estudio se caracterizaron morfológica y molecularmente 25 progenies del "Ensayo de procedencias y progenies de *Cordia alliodora*" perteneciente al programa de mejoramiento genético de Cenicafe en Colombia. Para la caracterización morfofisiológica se evaluaron las siguientes variables: altura del fuste, diámetro a la altura del pecho (dap), sobrevivencia de los árboles, diámetro de la copa, número promedio de ramas por verticilo, diámetro promedio de las ramas y longitud de las hojas. Se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las progenies para todas las variables analizadas. En general, no se observó un patrón definido según la procedencia de los materiales evaluados. Las mejores progenies en términos de rendimiento (altura y dap) fueron dos progenies del departamento de Antioquia (A3 y A6) y una del departamento de Caldas (CL1). La caracterización molecular se llevó a cabo usando marcadores AFLP. Al igual que con los datos morfológicos, no se observó un patrón claro que relacione la procedencia de los materiales con su afinidad genética, lo cual probablemente se debe a la gran movilización que han tenido los genotipos de la especie a través del territorio colombiano, para ser usados como material para nuevas siembras. Por el contrario, algunas progenies obtenidas en sitios cercanos si mostraron afinidad genética, tal fue el caso de algunos materiales de Risaralda y Norte de Santander. Aunque la mayoría de los materiales tendieron a agruparse juntos, algunas progenies tales como V2, S1 y CL1, mostraron una gran divergencia, lo cual abre posibilidades para hibridaciones futuras, en busca de genotipos superiores. En este sentido, los marcadores moleculares fueron útiles para caracterizar el recurso

genético disponible dentro del programa de mejoramiento de Cenicafé y para recomendar cruces futuros con mayores posibilidades de éxito, al evitarse la endogamia debida al cruzamiento entre individuos muy emparentados. No se observó en este estudio, relación entre los resultados morfofisiológicos y moleculares, posiblemente debido a la gran influencia de los factores ambientales sobre las características fenotípicas y al hecho de que los marcadores moleculares representan sólo una fracción de todo el genoma, lo cual incluye regiones codificantes y no codificantes.

Palabras clave: *Cordia alliodora*, Caracterización morfológica, Caracterización molecular, AFLP, laurel, nogal cafetero, ensayo de procedencias, ensayo de progenies.

Márquez, M.P. 2003. Molecular and morphological characterization of tree progenies selected from Cenicafé's "Provenance and progeny trials of *Cordia alliodora*" – Colombia. MSc Thesis. CATIE. Turrialba, Costa Rica

SUMMARY

The study conducted the morphological and molecular characterization of 25 progenies selected from the "Provenance and progeny trials of *Cordia alliodora*" project, which is part of Cenicafé's genetic improvement program in Colombia. The following variables were evaluated for morphophysiological characterization: trunk height, diameter at breast height (DBH), tree survival, canopy diameter, number of branches per verticil, average branch diameter, and leaf length. Significant differences ($p \leq 0.05$) were found between progenies for all analyzed variables. In general, a defined pattern according to provenance of the evaluated material was not observed. The most favorable progenies in terms of performance (height and DBH) were those originating from the department of Antioquia (A3 and A6) and one from the department of Caldas (CL1). Molecular characterization was conducted using AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) markers. As with the morphological data, no defined pattern was detected which relates provenance with genetic affinity. This is most probably the result of the fact that species genotypes have been widely distributed throughout the Colombian territory for the establishment of plantations. On the other hand, several progenies obtained from sites closer to each other demonstrated genetic affinity, as was found in some materials obtained from Risaralda and Norte de Santander. Whilst the majority of materials tended towards being grouped, some progenies such as V2, S1 and CL1 diverged greatly, thus showing potential for being incorporated in hybridizations for the production superior genotypes. The molecular markers were useful in characterizing the genetic resources available within Cenicafé's genetic

improvement program, and for making recommendations regarding the future production of successful crossbreeds by avoiding endogamy. No relation was observed between the results of the morphophysiological and molecular evaluations, which may be due to the significant influence that environmental factors exert on phenotypic characteristics, coupled with the fact that molecular markers only represent a fraction of the entire genome, which include coded and non-coded regions.

Keywords: *Cordia alliodora*, morphological characterization, molecular characterization, AFLP, laurel, progeny trials, provenance trials

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Sitio de colecta y ubicación actual de las 25 progenies de <i>C. alliodora</i> incluidas en este estudio.	<u>24</u>
Cuadro 2. Altura del fuste obtenidos para 23 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>34</u>
Cuadro 3. Diámetro a la altura del pecho de 23 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>35</u>
Cuadro 4. Supervivencia de los árboles al interior de 23 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>36</u>
Cuadro 5. Número de ramas por árbol de 19 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>37</u>
Cuadro 6. Diámetro promedio de las ramas de 19 progenies de <i>C. alliodora</i> ..	<u>38</u>
Cuadro 7. Diámetro de las copas de 19 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>39</u>
Cuadro 8. Largo de la hoja de 20 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>40</u>
Cuadro 9. Ancho de la hoja de 20 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>41</u>
Cuadro 10. Combinaciones de "primers" evaluados usando 5 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>47</u>
Cuadro 11. Combinaciones de "primers" usadas para la caracterización de <i>C. alliodora</i>	<u>48</u>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Proceso de establecimiento de los ensayos de procedencias y progenies de <i>C. alliodora</i> . Cenicafé 1996 – 2003.....	<u>24</u>
Figura 2. Análisis de Componentes Principales con los datos morfológicos de las progenies evaluadas de <i>C. alliodora</i>	<u>43</u>
Figura 3. Dendrograma construido a partir de datos morfológicos con las progenies evaluadas de <i>C. alliodora</i>	<u>45</u>
Figura 4. Determinación de la calidad y concentración de ADN de <i>C. alliodora</i> por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%	<u>46</u>
Figura 5. Dendrograma UPGMA de 25 progenies de <i>C. alliodora</i> a partir de datos moleculares.....	<u>51</u>
Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales con el Árbol de Recorrido Mínimo con 25 progenies de <i>C. alliodora</i>	<u>54</u>

1. INTRODUCCIÓN

La conservación y el uso de los recursos genéticos es esencial para continuar y mantener la producción agrícola y forestal bajo una perspectiva de desarrollo sostenible. Durante las últimas décadas, con la acelerada deforestación de áreas boscosas naturales, el estudio de las especies forestales ha cobrado gran importancia. Los recursos genéticos forestales son de gran interés pues en ellos se encuentra la fuente para los programas de selección y mejoramiento de especies de valor comercial y ambiental.

Cordia alliodora (R & P) Oken es una especie neotropical de gran relevancia por el alto valor de su madera y su rápido crecimiento. Por esto, es ampliamente usada por los campesinos, quienes usualmente utilizan los árboles de regeneración natural para las nuevas siembras. Por la forma ligera de su copa, *C. alliodora* puede ser plantada junto con otras especies comerciales o cultivos agrícolas permanentes, siendo muy común en cultivos de café y cacao (CONIF 1983). En Colombia por ejemplo, el cultivo del café se ha asociado tradicionalmente a *Cordia alliodora*, usando esta especie principalmente como sombrío, para cercas vivas o linderos (Cenicafé 2000). Las buenas características de *C. alliodora* como son la calidad de su madera, su fuste muy recto, su hábito de autopoda y su copa rala la hacen muy apropiada para ser usado en sistemas agroforestales (Combe y Budowski 1979; Beer *et al.* 1981). Asimismo, expertos en recursos genéticos forestales de la FAO categorizaron a *C. alliodora* como una especie muy importante para la producción de madera y señalaron la urgente necesidad de realizar estudios botánicos y genealógicos en la especie (Boshier 1992).

A pesar de las ventajas que posee la especie para su explotación maderera en monocultivo o en sistemas agroforestales, los estudios encaminados a su mejoramiento no han sido muy abundantes. Es evidente que falta más investigación para evaluar la diversidad genética de la especie y poder aprovechar los resultados de estos estudios en los programas de mejoramiento.

1.1 Definición del problema

A pesar de que *C. alliodora* es ampliamente utilizada en los sistemas cafeteros Colombianos, nunca se ha efectuado una selección genética de los individuos empleados, encontrándose comúnmente árboles enfermos y malformados, que cuando se aprovechan no cumplen con las expectativas económicas trazadas. Se espera que en la medida en que se incremente la siembra de genotipos mejorados de *C. alliodora*, se aumenten significativamente los ingresos del caficultor (Cenicafé 2000).

La Federación Nacional de Cafeteros de Colombia y el Programa Ambiental del Ministerio del Medio Ambiente a través de un convenio especial de cooperación para la Investigación Forestal firmado en 1995, se encuentran desarrollando un programa de selección y mejoramiento genético de *C. alliodora* con el objetivo de seleccionar las mejores procedencias y progenies. La idea es seleccionar genotipos que posean características deseables para la producción industrial de madera adaptados a diferentes condiciones bioclimáticas y edáficas de la zona cafetera colombiana. Bajo el marco de dicho programa, actualmente se cuenta con ensayos de procedencias y progenies en campo, de donde se espera seleccionar los árboles élite.

Dentro de los programas de mejoramiento genético forestal es importante contar con una información confiable sobre la magnitud y distribución geográfica de la variación genética, la cual se puede determinar midiendo en el campo los caracteres morfológicos y métricos o a través de marcadores moleculares (Butcher *et al.* 1999).

Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones entre grupos de interés (Phillips-Mora 1995). Uno de los usos más generalizados de los marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético es la

identificación y selección de individuos (O'Malley *et al.* 1996), esto hace la selección más confiable y precisa.

El análisis AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), es una técnica poderosa para la detección y evaluación de la variación genética en colecciones de germoplasma y el estudio de la biodiversidad. Tiene la ventaja que permite obtener una gran cantidad de polimorfismos en forma simultánea y no requiere del conocimiento de la secuencia del ADN. Por otra parte es una técnica muy consistente y reproducible (Cornide 2000).

En el presente estudio se caracterizaron molecular y morfológicamente 25 progenies del programa de mejoramiento de *Cordia alliodora* de Cenicafé. La información colectada busca facilitar la selección y mejoramiento genético de esta especie en Colombia al incrementar las posibilidades de éxito mediante el cruzamiento de genotipos no emparentados y genéticamente más distantes

1.2 Objetivos

1.2.1 General

Caracterizar molecular y morfológicamente 25 progenies procedentes de árboles plus seleccionados dentro del "Ensayo de procedencias y progenies de *Cordia alliodora*" de Cenicafé – Colombia.

1.2.2 Específicos

- Determinar el nivel de variabilidad genética de las progenies de árboles plus de *Cordia alliodora* mediante el uso de marcadores moleculares AFLP.
- Caracterizar las progenies usando descriptores morfofisiológicos.
- Establecer diferencias genéticas entre las progenies seleccionadas.

- Comparar los resultados moleculares con los morfológicos.

1.3 Hipótesis

- Existe variabilidad genética y morfológica entre las 25 progenies de árboles plus de *Cordia alliodora* estudiadas.
- Existe relación entre los resultados moleculares y morfológicos.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Taxonomía

Cordia alliodora (Ruíz & Pavón) Oken pertenece a la familia Boraginaceae. La especie fue originalmente descrita como *Cerdana alliodora* por Ruíz y Pavón en 1799. A través del tiempo ha recibido diferentes nombres tales como *Cerdana alliodora* (Ruíz y Pavón), *Cordia tricotoma* (Vell.) Arrab y *Cordia gerascanthus* (Jacq) (Johnson y Morales 1979). *Cordia alliodora* var *glabra* DC, *Cordia gerascanthus* forma *martinicensis* Chodat, *Cordia alliodora* var. *boliviana* Chodat & Visher (Liegel y Stead sf). En 1841 Oken cambió el género por *Cordia* (Johnson y Morales 1979).

Actualmente su clasificación botánica es:

Familia: Boraginaceae

Subfamilia: Cordioideae

Género: ***Cordia***

Sección: Cerdanae

Especie: *alliodora*

El género *Cordia* es de distribución pantropical y comprende alrededor de 300 especies de las cuales todas son árboles y arbustos. Se han identificado siete secciones dentro del género *Cordia*, de las cuales cinco son actualmente aceptadas: Cerdanae, *Cordia*, Micranthae, Rhabdocalyx y Varroniae (Greaves y McCarter 1990).

Miller (1985 citado por Greaves y McCarter 1990) realizó una revisión detallada de la sistemática del género *Cordia* en México y Centro América. Encontró que la sección Cerdanae se restringe al neotrópico y consta de 30 especies aproximadamente. Trece de estas especies se encuentran en México y Centro América y dos de ellas se extienden más allá de estas regiones. *C. gerascanthus* se encuentra también en Sur América y *C. alliodora* desde México hasta Argentina.

2.2 Nombres comunes

C. alliodora es conocida con un gran número de nombres comunes como: laurel, laurel negro, laurel blanco, bojón, bojón prieto, hormigo, nogal cafetero, etc (Poel 1988; Greaves y McCarter 1990; Boshier y Lamb 1997).

En Colombia se conoce como moho (Cundinamarca, Tolima), nogal, nogal cafetero (Antioquia, Caldas, Huila, Quindío, Risaralda y Valle), canalete, solera (Magdalena medio, Urabá), pardillo (Arauca, Norte de Santander), laurel (Tolima, Tumaco), móncoro (Sabana de Torres), vara de humo (Bolívar), guásimo, guásimo nogal (CONIF 1983).

2.3 Distribución geográfica

La especie se distribuye naturalmente desde el norte de México a través de América Central y hasta Paraguay, el sur de Brasil y el norte de Argentina en América del Sur. Está presente también en la mayoría de las islas del Caribe desde Cuba hasta Trinidad.

A lo largo de su rango geográfico *C. alliodora* se presenta bajo una amplia gama de condiciones ecológicas, que varían desde muy húmedas hasta estacionales secas, y desde el nivel del mar hasta 1400 msnm en América Central y 2000 msnm en Colombia (Greaves y McCarter 1990).

En Colombia *C. alliodora* es nativa de la región del Magdalena medio, Arauca y zona del litoral Pacífico (Vega y Echeverri 1983), sin embargo actualmente la especie se encuentra dispersa en 24 departamentos en áreas con y sin estaciones secas severas, y a altitudes desde el nivel del mar hasta los 1900 msnm (Greaves y McCarter 1990). Los árboles han sido plantados en programas de reforestación en el Tolima, la costa del Pacífico, Antioquia y Caldas, y para sombrío de cafetales en Antioquia, Caldas, Quindío, Risaralda, Tolima y Cundinamarca (Mahecha y Echeverri 1983). Es muy común en las zonas regadas por la cuenca del Río Cauca y el Río Magdalena, incluyendo las laderas de la

Cordillera Occidental, Cordillera Central y la Cordillera Oriental, donde la especie es abundante entre los 1100 y los 1900 msnm (Greaves y McCarter 1990).

2.4 Características de la especie

C. alliodora es muy buena productora de semilla y se regenera fácilmente, es considerada una especie pionera o de claros y no típica del bosque maduro. Es moderadamente resistente al fuego y muy buena competidora en zonas adversas como el bosque seco.

C. alliodora es un árbol de larga vida, intolerante a la sombra, por lo que se conoce como una especie secundaria tardía, pionera en espacios grandes (Greaves y McCarter 1990; Boshier y Lamb 1997).

2.5 Descripción botánica

C. alliodora es un árbol de tamaño mediano a grande (30m de altura y 1m de diámetro). El fuste es recto y generalmente limpio de ramas a lo largo de un 50 – 60% de la altura total. Cuando el árbol es joven la corteza tiene un color pardo oscuro y no es muy fisurada. En la madurez, el fuste es acanalado, subcilíndrico, de color gris blanquecino con lenticelas en algunos sectores (Johnson y Morales 1979).

Las hojas son simples, pecioladas y alternas, más o menos puntiagudas en la base. La superficie adaxial puede tener pubescencia escasa en hojas jóvenes, pero se vuelve glabra en la madurez. El envés está cubierto por pelos estrellados. Los pecíolos son delgados y escasamente pubescentes (Boshier y Lamb 1997).

Las flores son hermafroditas, no especializadas, en grandes inflorescencias axilares o terminales. Son heteróstilas y opera un mecanismo de incompatibilidad que previene el autocruzamiento, así como el cruzamiento entre ciertos árboles (Boshier y Lamb 1997).

Se han realizado varios estudios para la determinación del número de cromosomas de *C. alliodora*, encontrándose discordancia entre ellos, Bawa (1973) encontró un número cromosómico $2n = 30$, mientras que Britton (1951) un número $2n = 72$. En estudios más recientes realizados por Boshier y Lamb (1997) se realizaron conteos de cromosomas a partir de tres procedencias de Costa Rica encontrándose números cromosómicos invariables de $2n = 30$ como los reportados por Bawa (1973).

2.6 Biología reproductiva

Luego de estudiar varias características reproductivas en diferentes especies del género *Cordia* que incluían *C. alliodora*, Boshier (1995) sugirió que dichas especies se originaron de un ancestro común que se presume contaba con un número básico de ocho cromosomas y que presentaba heterostilia. La heterostilia es un polimorfismo genéticamente controlado y se manifiesta principalmente por la presencia de dos o tres formas florales, las cuales en la mayoría de los casos difieren recíprocamente en la altura a la cual se encuentran los estigmas y las anteras (Ganders 1979).

La heterostilia en *C. alliodora* no es tan marcada y se expresa sólo como una variación en la longitud del estilo, encontrándose un *continuum* de tipos, desde cortos (donde los estilos se encuentran bajo las anteras), pasando por tipos donde el estigma y las anteras se encuentran al mismo nivel, hasta casos ocasionales de estilos largos ubicados por encima de las anteras (Boshier y Lamb 1997).

C. alliodora presenta una marcada polinización cruzada donde el viento y algunas avispas, abejas, mariposas, polillas, escarabajos y moscas juegan un papel importante (Greaves y Mc Carter 1990; Boshier *et al.* 1995a; Boshier y Lamb 1997). Esta especie presenta un grado variable de incompatibilidad, evitando de esta forma la endogamia (Boshier y Lamb 1997).

2.7 Variación fenotípica y genética

Se ha encontrado variabilidad fenotípica al estudiar poblaciones naturales de *C. alliodora*, principalmente en características como la altura baja de los árboles en zonas secas del Pacífico de Centro América y México, comparada con las poblaciones del bosque húmedo de la zona Atlántica (Greaves y McCarter 1990). En todos los sitios evaluados, las procedencias de la zona Atlántica han probado ser superiores y las diferencias entre procedencias de los ecotipos del Atlántico han sido muy pequeñas y poco significativas (Boshier y Mesén 1986).

Miller (citado por Greaves y McCarter 1990) realizó una revisión de especímenes de herbario colectados en Centro América y México y encontró amplias diferencias en las dimensiones de algunas características morfológicas como la longitud de la hoja.

Los campesinos en Colombia y Ecuador dicen poder distinguir entre laurel blanco y laurel negro (haciendo referencia al color de la madera) tratándose siempre de la misma especie. El laurel negro tiene albura liviana y de color café oscuro y el duramen generalmente veteado, mientras que el laurel blanco es todo de color claro (CONIF 1983). El laurel blanco es para los campesinos la forma típica que crece en las tierras bajas del Pacífico, mientras que el laurel negro es una variación que se encuentra hacia la amazonía y presenta flores dos a tres veces más grandes.

Algunas especies del género *Cordia* presentan domatios (estructuras formadas por las plantas donde albergan organismos, en este caso hormigas). En *C. alliodora* estas estructuras heredables se encuentran en las ramas y son habitadas por hormigas. Johnston (1949) encontró diferencias entre los domatios de árboles provenientes de la parte noroccidental de Sudamérica con los provenientes de la región oriental. Además, se ha notado que cuando los árboles son sembrados en sitios fuera de su rango natural, éstos continúan produciendo los domatios (Greaves y McCarter 1990).

En plantaciones de *C. alliodora* se ha notado la influencia de la calidad del sitio sobre las características de crecimiento y calidad de la madera. Salas y Franco (1978) realizaron una investigación sobre la relación entre el sitio y el crecimiento de los árboles y concluyeron que *C. alliodora* está más influenciada por las características físicas del suelo, como los perfiles que controlan el drenaje y la profundidad de las raíces, que por las características químicas.

Caycedo y Giraldo (1988) realizaron una evaluación de diferentes procedencias de *C. alliodora* en Colombia con el fin de seleccionar las que presentaran mejor dinámica y comportamiento inicial para establecer programas de fomento forestal. Algunas características como la sobrevivencia de los árboles presentaron diferencias significativas, a diferencia de otras como el crecimiento en altura y diámetro. Sin embargo la forma del fuste fue una característica muy variable entre las procedencias.

C. alliodora es una especie que parece adaptarse fenotípicamente a cambios en las condiciones ambientales; sin embargo, no ha sido comprobado que estas diferencias se deban a una amplia variabilidad genética. Es importante mencionar que hacen falta estudios a escala genética de características heredables que sean de importancia en programas de mejoramiento de la especie.

Hasta el momento las actividades de mejoramiento en *C. alliodora* han sido realizadas principalmente en Centro América. Boshier y Mesén comenzaron en 1983 un programa de mejoramiento seleccionando árboles plus dentro de rodales naturales en la región Atlántica de Costa Rica (Boshier y Mesén 1986). Se recolectaron semillas de polinización abierta para realizar ensayos de progenie de medios hermanos y se estableció un banco de clones incorporando árboles selectos, empleando material injertado sobre plantas de vivero. A través de la selección de árboles plus en Costa Rica estos autores encontraron formas muy variadas de los árboles dentro de los rodales naturales de *C. alliodora*, lo cual en algunos casos puede limitar la cantidad de madera aprovechable. Según estos

autores, esta gran cantidad de formas en los árboles indica una gran variabilidad genética dentro de la especie y la posibilidad de ganancias significativas por medio de la selección (Boshier y Mesén 1986).

En estudios de la genética de poblaciones realizados por un grupo de la Universidad de Oxford se introdujo el uso de marcadores bioquímicos (isoenzimas) al estudio de esta especie. Sus investigaciones en poblaciones de *C. alliodora* de diferentes regiones de Centro América arrojaron importantes resultados.

En un primer estudio (Chase *et al.* 1995) se correlacionaron patrones de variación con isoenzimas y se analizó la relación entre parámetros genéticos y ambientales. Se seleccionaron 11 poblaciones distribuidas en diferentes climas y altitudes de Centro América y se analizaron los resultados de variación obtenidos con siete sistemas de enzimas que presentaron patrones de bandeo constante. Se revelaron diferencias significativas en las frecuencias alélicas entre poblaciones de la costa Pacífica y de la costa Atlántica y aunque en esta última el crecimiento fue mayor, las poblaciones del Pacífico presentaron mayor índice de heterocigocidad. Se concluyó que esta heterocigocidad es inversamente proporcional a la precipitación y que probablemente las zonas secas contienen una mayor diversidad genética (Chase *et al.* 1995).

En otro estudio posterior (Boshier *et al.* 1995a) se estimó la tasa de cruzamiento y se determinó si la consanguinidad era mayor que la autopolinización. Se evaluaron 49 familias ubicadas en Costa Rica y se usaron cuatro sistemas de enzimas. Se encontró que la población estudiada tiene predominantemente polinización cruzada, lo cual apoya la existencia de un marcado mecanismo de autoincompatibilidad y la presencia, aunque no en gran medida, de consanguinidad. El mecanismo de autoincompatibilidad, junto con variaciones en la floración y una densidad constante parecen permitir la subestructuración temporal y espacial de la población (Boshier *et al.* 1995a).

También se investigó el flujo de polen y dispersión de semillas en una población natural, para lo cual las isoenzimas y la exclusión de paternidad fueron de gran utilidad. Se encontró que árboles más cercanos están genéticamente más relacionados que los árboles más distantes. Los resultados indicaron que la deforestación y la fragmentación pueden reducir el flujo de genes, induciendo a la erosión genética (Boshier *et al.* 1995b).

El uso de marcadores moleculares como una herramienta para evaluar la diversidad genética de *C. alliodora* ha sido poco explorado. En Colombia se han realizado dos estudios usando RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) para evaluar la diversidad genética de progenies seleccionadas en el programa de mejoramiento genético de Cenicafé. Peláez (1999) realizó un estudio para determinar la diversidad genética de *C. alliodora* en el departamento de Risaralda y encontró una alta variabilidad entre árboles que se encuentran geográficamente cercanos. En otro estudio realizado por Marulanda *et al.* (2000), se evaluaron 101 árboles *plus*, seleccionados por Cenicafé con características fenotípicas de interés comercial y que son la base del programa de selección y mejoramiento de ese centro. Los resultados mostraron una diversidad genética relativamente alta.

2.8 Características morfológicas

En programas de mejoramiento genético forestal se utilizan diseños experimentales que permiten relacionar el componente genético con los caracteres fenotípicos de importancia para los forestales como la altura del fuste, el volumen y la sobrevivencia. Para esto se establecen ensayos de procedencias usando diseños experimentales que toman en cuenta la variación ambiental (Boshier y Henson 1997).

En ensayos internacionales de procedencias realizados en *C. alliodora* en Centro América han sido evaluadas variables como la sobrevivencia, altura total, diámetro a la altura del pecho, altura de la troza, volumen, forma del fuste,

bifurcación, densidad, tipo de corteza, porcentaje de corteza e incidencia de plagas.

En el caso específico del ensayo de procedencias y progenies establecido por Cenicafe en Colombia, los criterios fenotípicos de selección de los individuos fueron elegidos en función del uso final de las plantaciones (Cenicafe 2000). En las evaluaciones de los ensayos establecidos en el campo se realizaron mediciones de altura del fuste, diámetro a la altura del pecho, sobrevivencia, diámetro de la copa, número de ramas por verticilo y tamaño de las hojas

2.9 Marcadores moleculares

Por muchos años el mejoramiento de especies de interés comercial se ha realizado mediante la selección en el fenotipo de los individuos; sin embargo, es sabido que el ambiente tiene gran influencia sobre muchos de los caracteres. Los marcadores moleculares a diferencia de los marcadores morfológicos revelan diferencias entre genotipos a nivel del ADN, las cuales no necesariamente están asociadas a genes, por lo que se dicen que son neutras. Estas diferencias pueden darse en solo un nucleótido o en un segmento de ADN repetitivo (Cornide 2000).

Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como, estimar la diversidad y las relaciones genéticas entre grupos de interés (Phillips-Mora 1998). El uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético forestal, permiten la caracterización genotípica del material, el análisis de la estructura genética, el entendimiento de la base genética para el control de características de interés comercial y la selección asistida por marcadores (MAS) (Carson *et al.* 1996).

La caracterización molecular usando marcadores tiene varias ventajas, tales como: los marcadores no están influenciados por el ambiente, cualquier parte de la planta en cualquier estado de crecimiento puede ser usada, el número de

análisis es ilimitado, se requiere de pequeñas cantidades de material vegetal, la cantidad de ADN es ilimitado, se presenta un alto nivel de polimorfismo (# de alelos / locus) que están distribuidos en todo el genoma (León 1998).

Los avances de la biología molecular obtenidos en las últimas décadas, ponen a disposición de los mejoradores forestales una serie de herramientas para acelerar los procesos de mejoramiento y para potencializar las ganancias genéticas (Carson *et al.* 1996, Dale y Chaparro 1996).

Algunos trabajos demuestran que los marcadores moleculares pueden ser usados para explotar la variación genética útil con una precisión que no puede ser alcanzada a través de la selección y mejoramiento convencional con marcadores fenotípicos (Dale y Chaparro 1996).

2.10 Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Esta técnica se basa en la amplificación por PCR (Polymerase Chain Reaction) de fragmentos de restricción genómicos homólogos y que presentan tamaños diferentes en los distintos organismos, combinando la digestión con enzimas de restricción con la PCR (Vos *et al.* 1995). La técnica detecta múltiples loci polimórficos a través del genoma. Son útiles para generar huellas genéticas o para mapeo genético. La mayoría de fragmentos AFLP corresponden a posiciones únicas en el genoma y por lo tanto pueden ser usados como marcadores en mapeo físico y genético (Joshi *et al.* 1999).

Las ventajas que ofrece el método AFLP son su confiabilidad y consistencia, debido a las condiciones de alta astringencia bajo las cuales se llevan a cabo las reacciones en cadena de polimerasa, y la habilidad de detectar rápidamente muchos loci polimórficos.

El procedimiento involucra varias etapas, el primer paso consiste en la digestión del ADN con dos enzimas de restricción específicas, una de corte raro y

otra de corte frecuente. Enseguida, se ligan adaptadores a los extremos de los fragmentos para proporcionar secuencias conocidas para la amplificación con PCR. Estos adaptadores son necesarios porque la secuencia en el sitio de restricción al final del fragmento no es suficiente para el diseño de los "primers". Cortas extensiones de secuencias conocidas son adicionadas a los extremos de los fragmentos a través del uso de una ligasa. Los "primers" son diseñados de manera que incluyan la secuencia del adaptador conocido más 1, 2 o 3 pares de bases adicionales (Karp *et al.* 1997).

El método de los AFLPs presenta varias ventajas con respecto a otras técnicas, entre ellas:

- Se requiere una pequeña cantidad de ADN para la reacción.
- Los resultados no son afectados por los cambios de concentración del ADN en un amplio rango de valores.
- El número de polimorfismos por reacción en tiempo muy corto es mayor que el obtenido por RFLP o por RAPD debido a que la técnica genera perfiles con un gran número de bandas en forma simultánea.
- No es necesario conocer secuencias de genoma de la especie estudiada, ni la construcción de librerías genómicas.
- La técnica puede ser automatizada.

Los marcadores AFLP presentan algunas limitaciones como el bajo contenido de información genética por locus. Solo es posible detectar un alelo, es decir, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo. Los marcadores AFLP son por lo tanto, marcadores "dominantes" y los datos tienen naturaleza binaria.

El análisis de marcadores AFLP incluye un mayor número de etapas que el análisis de RAPD. Es necesario una mayor cantidad de reactivos, y un mayor

número de equipamiento de biología molecular. El ADN necesario debe ser más puro, lo que demanda métodos de extracción más elaborados (León 1998).

La técnica AFLP requiere de un ADN de buena calidad, de manera que las enzimas de restricción puedan actuar sobre los sitios de restricción en el ADN. Para garantizar un aislamiento de ADN de buena calidad es muy importante tener en cuenta la edad y calidad de las hojas que se usan para las extracciones, de esta manera las hojas jóvenes y en buen estado facilitan el aislamiento de ADN de mejor calidad.

2.11 Mejoramiento genético forestal

El mejoramiento genético forestal se define como la identificación y el desarrollo de poblaciones genéticamente superiores de especies forestales y el uso de estas poblaciones como fuentes de semilla para establecer plantaciones mejoradas (Cornelius 1994).

El principal objetivo del mejoramiento genético forestal es aumentar la productividad y mejorar la calidad de los árboles (Zobel y Talbert 1984). Casi todo programa busca mejorar alguna característica relacionada con la productividad, como el diámetro de un árbol a una edad específica, altura o volumen del árbol individual. Frecuentemente, los objetivos específicos incluyen también el mejoramiento de la forma del árbol, por ejemplo en cuanto a reducir el grosor de las ramas, la tendencia a bifurcarse o la producción de fustes torcidos. Sin embargo casi cualquier rasgo de los árboles muestra variación genética y por lo tanto ofrece la posibilidad de ser mejorado si las circunstancias justifican la acción (Cornelius 1994).

Las diferencias observables entre los árboles de una especie tienen dos orígenes: la variación ambiental y la variación genética. La existencia de la variación genética es indispensable para el mejoramiento genético forestal (Cornelius 1994). Las ganancias en el mejoramiento genético forestal son

determinadas por la intensidad de la heredabilidad y la buena manipulación de la variación presente en la población sobre la cual se está trabajando (Zobel y Talbert 1984).

Características cualitativas como la forma del fuste, hojas, flores, frutos y semillas, generalmente están determinadas por factores genéticos y tienen gran propensión a heredarse de generación en generación. Por el contrario características cuantitativas como la tasa de crecimiento, la producción de frutos o resinas, están fuertemente influenciadas por el ambiente (Pedersen *et al.* 1993).

Generalmente la variación genética y la variación ambiental se presentan al mismo tiempo y sus efectos sobre los árboles se mezclan, por esta razón nada puede decirse del valor genético de un árbol basándose únicamente en su apariencia. Uno de los problemas básicos del genetista forestal es por lo tanto, el poder reconocer la variación genética y separarla de la variación ambiental (Cornelius 1994).

Dentro de un programa de mejoramiento genético es de gran importancia la selección de la procedencia, desarrollar un programa de mejoramiento con una especie muy uniforme más allá del nivel de procedencias puede ser de poca utilidad. Un ensayo de procedencias es una herramienta esencial para estimar el grado de variación que existe dentro de una especie (Pedersen *et al.* 1993).

Procedencia se define como el área geográfica y ambiental donde crecieron los árboles progenitores y dentro de la cual se ha desarrollado su constitución genética. Un ensayo de procedencias es una plantación de varias procedencias establecidas en tal manera que permite una comparación estadísticamente válida entre ellas en cuanto a productividad y otras características. Pueden darse grandes diferencias en comportamiento entre las procedencias para características de interés económico, las procedencias no necesariamente se comportan igual en ambientes diferentes (interacción genotipo – ambiente). La

selección de procedencias es una etapa básica en el mejoramiento genético forestal, proporcionando el punto de partida para actividades de mejoramiento genético más avanzadas (Mesén 1994).

Los objetivos de las pruebas de procedencias son: identificar las procedencias más sobresalientes en términos de volumen, forma y calidad del material producido y capacidad para producción sostenida; Determinar si existen interacciones genotipo – ambiente y si las interacciones son importantes, identificar las mejores procedencias para cada sitio; Identificar las procedencias con mayor potencial para mejoramiento más avanzado y producir material de selección para construir la población de mejoramiento, además de conocer los patrones de variación genética entre poblaciones de la especie (Mesén 1994).

Los ensayos de progenies son establecidos con el objetivo de determinar el valor genético de los árboles progenitores o para la determinación de otras características genéticas de importancia en programas de mejoramiento genético forestal (Zobel y Talbert 1984). Entre las funciones de los ensayos de progenies se encuentra: eliminar individuos de bajo valor genético, conocer el valor relativo de los individuos de la población de producción, mejorar la eficiencia del diseño de cruzamientos y mejorar la eficiencia de la selección de futuras poblaciones base (Mondino *et al.* 2002). El término progenie se refiere a los árboles producidos a partir de la semilla de un árbol progenitor (Zobel y Talbert 1984).

El uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético forestal es cada vez más frecuente. Los usos más comunes incluyen la estimación de polimorfismos, el establecimiento de parámetros de parentesco y sistemas de apareamiento, la caracterización genotípica y la selección asistida por marcadores. El uso de un marcador específico depende de la información biológica de la especie que se encuentre disponible, la precisión de la información que se requiera y las facilidades técnicas de las que se dispongan (Wickneswari *et al.* 1996).

Una evaluación del nivel de variación genética entre y al interior de las poblaciones es un pre-requisito para los programas de selección y mejoramiento forestal. El uso de marcadores de ADN junto con características fenotípicas (marcadores morfológicos) como indicadores de diversidad genética tiene una aplicación valiosa en las líneas de selección y mejoramiento (Wickneswari *et al.* 1996).

Algunos ejemplos del uso de marcadores moleculares en combinación con características fenotípicas en programas de mejoramiento de especies forestales tropicales incluyen *Acacia auriculiformis*, *Acacia mangium*, *Hevea brasiliensis*, *Hopea odorata*, *Shorea leprosula* y *Tectona grandis*. En estas especies los marcadores han sido usados como una herramienta útil para el desarrollo de estrategias de mejoramiento apropiadas; se puede destacar la identificación y selección de clones o grupos divergentes como candidatos útiles para establecer cruces con el objetivo de obtener progenies con alto valor heterocigótico. También se han escogido progenies de fenotipos superiores para el establecimiento de ensayos de progenies que pueden ser útiles para la selección de árboles plus para el clonaje y futuro mejoramiento genético de las especies (Wickneswari *et al.* 1996).

Todo programa de mejoramiento debe estar diseñado de manera que se conserven los genes y los complejos de genes de valor, con el objetivo de maximizar a largo plazo las ganancias en características de importancia económica y de adaptabilidad. Por esto al momento de conformar la base para el programa es importante hacerlo de manera que las ganancias potenciales no sean constreñidas por una reducción en la base genética o por los efectos de la depresión por cruzamiento de individuos muy emparentados (Zobel y Talbert 1984).

2.12 Análisis Estadístico

La distancia genética según Nei se refiere a cualquier medida cuantitativa de la diferencia genética, a nivel de frecuencias alélicas o de secuencias de ADN estimada entre individuos, poblaciones o especies. Esta puede expresarse como la probabilidad de que dos variantes tomadas al azar en la población sean diferentes (diversidad génica) o como la proporción de variantes del total de variantes presentes entre dos poblaciones, individuos o grupos (índice de similitud) (Cornide 2000).

Los datos que se generan en los análisis con marcadores moleculares generalmente son de tipo discreto, los cuales denotan presencia o ausencia de un carácter (fragmento o banda); otros son de tipo multiestado (polimorfismos de las secuencias de nucleótidos). La hipótesis general es que las características usadas son independientes entre sí. Los estimados de disimilitud entre cada par de unidades son estimados de la distancia entre éstas. Existen varios tipos de distancias:

- * Distancia multivariada: se basa en la diversidad de varios caracteres fenotípicos evaluados a nivel de individuos o poblaciones.
- * Distancia genética: se basa en el polimorfismo del ADN revelado por marcadores moleculares a nivel alélico o de fragmentos de ADN.
- * Distancia genealógica: basada en el complemento del estimador del coeficiente de consanguinidad o del coeficiente de ancestría.

Estos estimados se consideran como una medida de la diferenciación genética entre las unidades biológicas estudiadas a pesar de que en muchos casos no se conozca la naturaleza genética de las variantes polimórficas consideradas.

La diversidad fenotípica puede estimarse e interpretarse como distancias multivariadas. Los genotipos se agrupan y estos agrupamientos pueden variar en

dependencia de los efectos genéticos, ambientales y de la interacción genotipo x ambiente.

Índices de similitud

En los estudios con marcadores moleculares se obtienen datos binarios de presencia (1) o ausencia (0) de bandas de manera que se requiere el uso de índices de similitud apropiados a estos datos como son Jaccard, Dice, Hamman, entre otros. Estos coeficientes expresan la concordancia entre cada par de unidades experimentales o unidades de organización taxonómicas (OTU), para una serie de caracteres de 2 o más estados de la siguiente manera:

		Individuo j		Total
		1	0	
Individuo i	1	a	b	a + b
	0	c	d	c + d
Total		a + b	c + d	n

Donde:

a = presencia tanto en i como en j (doble presencia)

b = presencia en i y ausencia en j

c = ausencia en i presencia en j

d = ausencia tanto en i como en j (doble ausencia)

n = tamaño total de la muestra

Para calcular la distancia genética entre dos individuos los índices de Jaccard y Dice no consideran la condición d, es decir la doble ausencia (0,0) de la banda, por su parte Dice duplica el peso para las dobles presencias (1,1).

$$\text{Índice de Jaccard: } S = \frac{a}{(a + b + c)}$$

$$\text{Índice de Dice: } S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

(Cornide y Coto 2000)

A partir de los datos obtenidos aplicando el índice de similitud se construye una matriz de similitud o de distancias genéticas, se escoge el algoritmo para la clasificación y posteriormente se realiza el agrupamiento de los individuos en salidas gráficas del análisis (Crisci y López 1983).

Cuando se trabaja con dos tipos de matrices, en este caso una matriz de distancias genéticas y una matriz de distancias morfológicas, en general es importante conocer si existe correlación entre los dos grupos de datos. Mantel (1967) desarrolló un test para una matriz de correspondencia con el fin de medir el grado de relación entre las dos matrices (Z), calculado a partir de las bases reales comparándolas con la serie de valores obtenidos por permutaciones aleatorias de las poblaciones dentro de una de las dos matrices de distancia (Applied Biostatistics 1998).

3. MATERIALES Y METODOS

3.1 Localización del estudio

Esta investigación se realizó de febrero a agosto de 2003 e implicó una fase de laboratorio y una de campo. La fase de campo se realizó en los departamentos colombianos de Caldas, Antioquia y Huila durante los meses de marzo, abril y mayo. El material experimental usado forma parte de ensayos previamente establecidos por Cenicafé en zonas cafeteras colombianas, según se explicará en el siguiente acápite.

La fase de laboratorio se llevó a cabo entre los meses de marzo a agosto en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira, dentro del marco de un convenio entre dicha universidad y Cenicafé para la caracterización molecular de especies forestales nativas.

3.1.1 Selección previa de árboles plus

El material genético que se utilizó en este estudio forma parte de experimentos establecidos por Cenicafé en diferentes zonas cafeteras colombianas. La Figura 1 muestra un esquema del proceso seguido para el establecimiento de los ensayos y toma de las muestras.

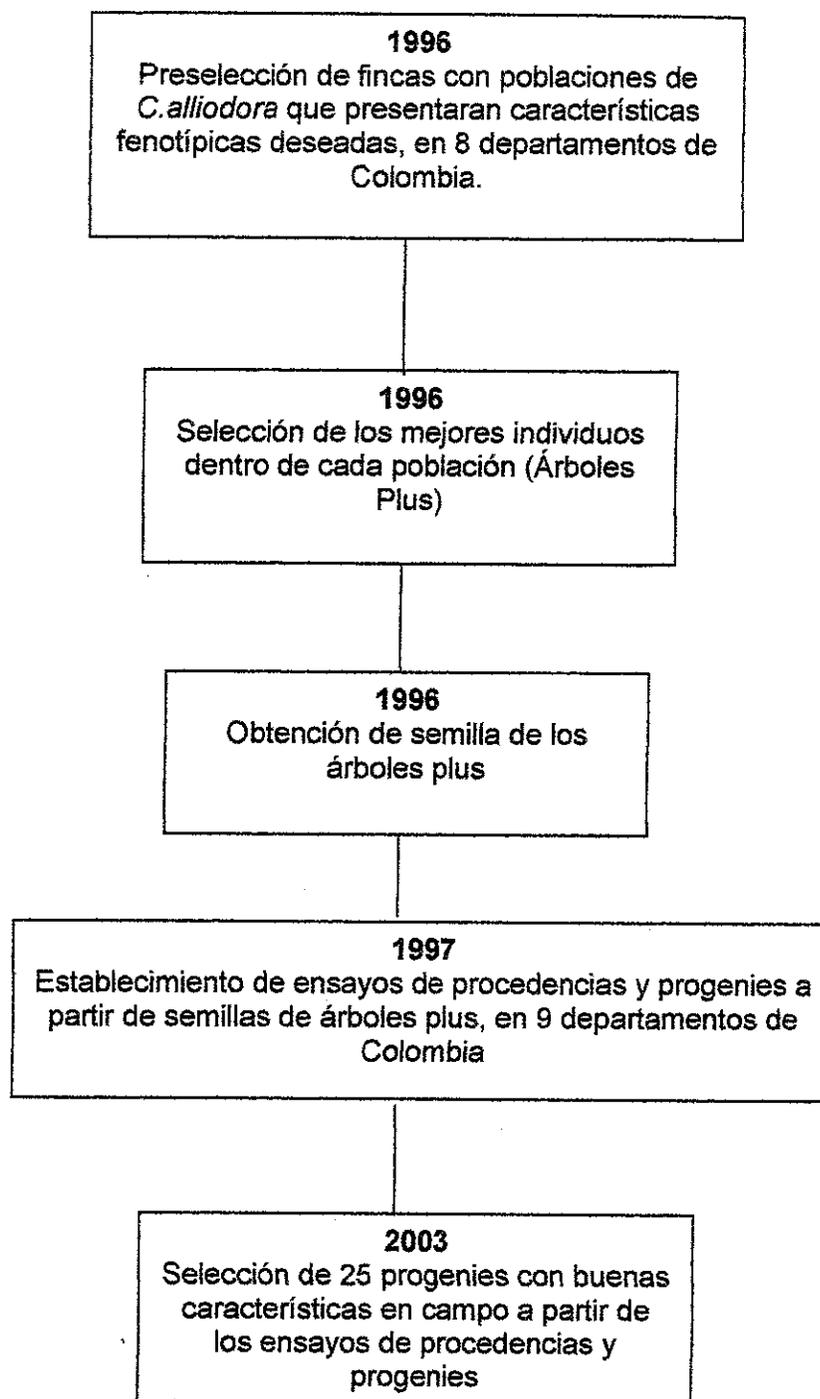


Figura 1. Proceso de establecimiento de los ensayos de procedencias y progenies de *C. alliodora*. Cenicafé 1996 – 2003.

A continuación se describe el origen de estos experimentos:

En 1996 Cenicafé con ayuda del Servicio de Extensión de la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia realizaron una preselección de fincas ubicadas en 8 departamentos de Colombia (Antioquia, Caldas, Cundinamarca, Norte de Santander, Risaralda, Santander, Tolima y Valle del Cauca). El factor común de estas fincas era que poseían poblaciones de *C. alliodora* con características fenotípicas deseadas tales como: fuste cilíndrico, libre de rajaduras, sin acanalamientos ni bifurcaciones; copa pequeña, angosta y simétrica; ramas delgadas y distribuidas simétricamente en verticilos separados; vigor y dominancia sobre los demás individuos de la población; libre de plagas y enfermedades. Posteriormente, al interior de cada población se seleccionaron los mejores individuos, cada uno de los cuales fue considerado un árbol plus, del cual se obtuvo la semilla que dio origen a una progenie (Cenicafé 2000). En total fueron seleccionados 114 árboles.

En 1997, a partir de la semilla obtenida de los árboles plus, Cenicafé estableció en nueve departamentos colombianos (Antioquia, Caldas, Cauca, Cesar, Huila, Norte de Santander, Santander, Risaralda y Tolima) los ensayos de procedencias y progenes. Esto se hizo con el objetivo de evaluar los materiales bajo diferentes condiciones bioclimáticas representativas de la zona cafetera colombiana. Algunas características morfológicas como: altura, diámetro a la altura del pecho (DAP) y sobrevivencia de los árboles han sido evaluadas por Cenicafé en todos los ensayos durante los últimos ocho años.

Además dentro de estos experimentos fueron incluidas progenes de semillas Centroamericanas de Costa Rica, El Salvador y Nicaragua, con el objetivo de comparar el comportamiento de estos árboles bajo las condiciones edáficas y climáticas colombianas.

3.1.2 Selección de las accesiones para el estudio

Para este estudio se seleccionaron 25 progenies, listadas en el Cuadro 1, por presentar el mejor comportamiento en campo, en términos de altura y DAP.

Cuadro 1. Sitio de colecta y ubicación actual de las 25 progenies de *C. alliodora* incluidas en este estudio.

Código de la progenie	Denominación usada por Cenicafé	Sitio de colecta de la progenie	Ubicación del ensayo de progenies
A1	A-I-2-2*	Antioquia - Fredonia	Caldas
A2	A-I-2-3	Antioquia - Fredonia	Caldas
A3	A-IV-1-1	Antioquia - Támesis	Caldas
A4	A-IV-1-2	Antioquia - Támesis	Caldas
A5	A-V-1-1	Antioquia - Venecia	Caldas
A6	A-V-1-2	Antioquia - Venecia	Caldas
BL1	BL 001494A	Costa Rica - San Carlos	Caldas
BL2	BL 4564	Costa Rica - Alajuela	Caldas
CL1	CL-I-1-1	Caldas - Chinchiná	Caldas
CU1	CU-I-1-8	Cundinamarca - El Colegio	Antioquia
NS1	NS-V-3-3	Norte de Santander - Sardinata	Caldas
NS2	NS-V-3-4	Norte de Santander - Sardinata	Caldas
R1	R-I-3-1	Risaralda - Marsella	Caldas
R2	R-III-2-5	Risaralda - Pereira	Caldas
R3	R-IV-1-2	Risaralda - Belén de Umbria	Caldas
R4	R-IV-1-4	Risaralda - Belén de Umbria	Caldas
R5	R-IV-2-1	Risaralda - Belén de Umbria	Huila
R6	R-VII-2-2	Risaralda - Santuario	Huila
R7	R-VIII-1-3	Risaralda - Quinchía	Antioquia
S1	S-IX-1-2	Santander - San Benito	Caldas
SV1	SV 195	El Salvador - Ciudad Arce	Caldas
T1	T-I-1-2	Tolima - Melgar	Caldas
T2	T-I-1-4	Tolima - Melgar	Caldas
V1	V-I-1-1	Valle del Cauca - Ulloa	Caldas
V2	V-I-1-3	Valle del Cauca - Ulloa	Caldas

* En el código de las progenies colombianas la letra mayúscula identifica el departamento de origen (procedencia), el número romano identifica el municipio, el número arábigo identifica la población y el último número arábigo identifica el árbol al interior de la población (Cenicafé 2000).

Las progenies seleccionadas forman parte de ensayos de campo ubicados en los departamentos de Caldas, Antioquia y Huila. Solamente se consideraron las progenies en estos departamentos por la accesibilidad para la colecta del material.

Todos los ensayos de campo se encuentran establecidos bajo un diseño experimental. En estos ensayos la unidad experimental es de 12 árboles, no hay repeticiones por tratamiento y el arreglo de los tratamientos es completamente al azar

3.2 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se utilizaron los datos colectados por Cenicafé durante los primeros cuatro años de evaluación de las progenies (1997-2001). Las variables evaluadas fueron: altura del fuste, diámetro a la altura del pecho (DAP) y sobrevivencia total de los árboles en las parcelas.

Además en 2003 y con la ayuda de técnicos de Cenicafé, se llevaron a cabo mediciones del diámetro de la copa, número de ramas, diámetro de las ramas y tamaño de las hojas. El diámetro de la copa se determinó haciendo una proyección vertical de la misma sobre el suelo, luego se midió el diámetro de esta proyección en sentido este – oeste y norte – sur y se promediaron los resultados para cada árbol. A cada árbol se le contó el número total de ramas por verticilo. Con ayuda de una tijera telescópica se bajaron dos ramas por árbol, se les midió el diámetro con un calibrador y se promediaron los resultados para cada árbol. También se tomaron hojas de todos los árboles de la progenie y se midió el largo y ancho de 100 hojas tomadas al azar.

3.3 Caracterización molecular

3.3.1 Material usado

En cada parcela se colectaron hojas jóvenes y sanas de cada uno de los árboles de la progenie, las cuales fueron empacadas en papel aluminio y debidamente rotuladas. Con el fin de evitar la oxidación del material vegetal y garantizar una buena calidad de ADN, las muestras fueron trasladadas al laboratorio y almacenadas a -70°C.

Una vez en el laboratorio, se procedió a macerar individualmente cada muestra en un mortero usando nitrógeno líquido. El material macerado se

almacenó en tubos falcon (15ml) a -70°C hasta su utilización.

Para cada una de las progenies se preparó una muestra mixta combinando aproximadamente 0,1g de macerado de cada uno de los árboles de la progenie (pool de ADN). A partir de las 25 muestras mixtas se hicieron las extracciones de ADN.

3.3.2 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se usó una modificación del protocolo descrito por Doyle y Doyle (1990), a partir de 1,0g de tejido fresco macerado, el cual se describe en detalle en el Anexo 1.

3.3.3 Cuantificación del ADN

El ADN se cuantificó usando un fluorómetro Hoefer DyNA Quant 200 y también por electroforesis en gel de agarosa al 0,8%. Estas últimas se realizaron tomando 5 µl de ADN a los que se les adicionó 3µl de solución Blue Juice (azul de bromofenol + glicerol). Las muestras se cargaron en un gel de agarosa contenido en una cámara de electroforesis horizontal y se dejaron migrar durante 1 h a 70w. Posteriormente, los geles fueron visualizados en luz ultravioleta y los registros fueron guardados en archivos digitales. Para la comparación de las concentraciones de ADN se utilizaron patrones de lambda de 50, 100 y 200 ng/µl.

3.3.4 AFLPs (Amplified fragment length polymorphisms)

El ADN de cada una de las progenies fue analizado mediante AFLPs. Para esto se usó el "kit" AFLP Analysis System I de Invitrogen, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante el cual se resume a continuación.

La metodología de AFLP incluye los siguientes pasos: digestión del ADN con enzimas de restricción, ligación, preamplificación y amplificación.

Digestión del ADN: para la digestión se usaron las enzimas de restricción contenidas en el "kit", una de corte frecuente (*MseI*) que reconoce 4 pares de bases en el sitio de corte y otra de corte raro (*EcoRI*) que reconoce seis pares de bases en el sitio de corte. Para la reacción de digestión se usaron 2,5µl de buffer 5X, 1µl de las enzimas *EcoRI/MseI* y 6µl de agua, para un volumen total de 12,5µl por cada muestra. Cada reacción contenía 12,5µl de la mezcla más 3µl de ADN a una concentración de 100ng /µl. La digestión se llevó a cabo a 37°C durante dos horas, seguido por 15 minutos a 70°C. Posteriormente las muestras fueron puestas en hielo hasta alcanzar 4°C.

Ligación del ADN: este paso consiste en unir adaptadores específicos a los sitios cohesivos que han dejado los cortes con las enzimas de restricción, con el fin de generar secuencias conocidas para la amplificación. La mezcla de ligación contenía 12µl de la solución de adaptadores más 0,5µl de la enzima T4 ligasa, para un volumen total de 12,5µl por reacción, el cual se le agregó a los tubos con el ADN digerido y se llevaron por dos horas a 20°C. De la mezcla de la digestión – ligación se hizo una dilución 1:10 en TE.

Preamplificación (PCR+1): esta amplificación utiliza "primers" con secuencias complementarias a cada uno de los "primers" más una base adicional en el extremo 3'. Solo se amplifican los fragmentos en los cuales el nucleótido que flanquea el sitio de restricción es complementario al nucleótido seleccionante. La mezcla utilizada para esta reacción contenía 20µl de "preamp primer mix", 2,5µl de buffer 10X para PCR y 0,1µl de *taq* polimerasa Promega® (5U/µl). A los 22,6µl de esta reacción se les adicionó 2,5µl de la solución de ADN y se llevó a cabo la PCR en un termociclador MJ research PTC-100 utilizando el siguiente programa: 20 ciclos cada uno de 94°C 30 segundos, 56°C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos. El producto de la preamplificación se diluyó en TE en proporción 1:5.

Amplificación selectiva (PCR +3/+3): esta reacción se realiza con "primers" que poseen la misma secuencia de los "primers" de preamplificación

más dos bases de selección en los extremos 3'. Esta PCR se realiza bajo condiciones controladas de temperatura, garantizando la confiabilidad y reproducibilidad de la técnica. En esta fase se prepararon dos mezclas de reacción así: la mezcla 1 que contenía 0,2µl del "primer" *EcoRI*, 4,5µl del "primer" *MseI* y 0,3µl de agua. La mezcla 2 que contenía 2µl de buffer 10X PCR, 0,1µl de *taq* polimerasa Promega® (5U/µl) y 7,9µl de agua. Posteriormente para cada reacción se mezclaron 5µl de la mezcla 1 más 10µl de la mezcla 2 y 5µl de la dilución de la PCR +1. La amplificación de ADN se realizó en un termociclador MJ research PTC-100 utilizando el siguiente programa: un ciclo inicial de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65° C y 60 segundos a 72°C. Posteriormente se repitieron 25 ciclos, reduciendo la temperatura de acoplamiento en 0,7°C en cada ciclo por 12 ciclos. En el Anexo 2 se hace una descripción detallada de los protocolos usados para los AFLPs.

La visualización de los fragmentos se realizó en geles de poliacrilamida al 6%, los cuales fueron corridos en cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen GT Sequencing Cell de BioRad, a 110W durante dos horas y media a una temperatura de 50°C. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata. Los protocolos detallados de la electroforesis y la tinción se encuentran en el Anexo 3.

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Variables analizadas

Se analizaron las siguientes variables: altura del fuste, diámetro a la altura del pecho (DAP), sobrevivencia, longitud y ancho de la hoja, número de ramas por árbol, diámetro promedio de las ramas y diámetro de la copa.

3.4.1.1 Análisis de varianza

Para el estudio de las variables morfológicas se usó un diseño irrestricto al azar, el cual sigue el siguiente modelo:

$$Y_{ij} = \mu + \tau_i + \varepsilon_{ij}$$

donde:

μ = media poblacional

τ = tratamiento

ε_{ij} = error experimental

El análisis de los datos se hizo usando el programa Infostat versión 1.5: Se realizó un análisis de varianza para cada variable estudiada. Para evaluar la significancia entre las medias de los tratamientos se aplicó una prueba de comparación DGS (Di Rienzo, Guzmán y Casanoves) la cual utiliza la técnica multivariada de análisis de conglomerados sobre una matriz de distancia obtenida a partir de las medias muestrales.

Para las variables: altura del fuste, DAP y sobrevivencia de los árboles fueron excluidas del análisis las progenies S1 y SV1 debido a que son de edad diferente a las restantes. Así mismo, para las variables número de ramas, diámetro promedio de las ramas, diámetro de la copa y largo y ancho de la hoja se excluyeron las progenies CU1, R5, R6, R7, S1 y SV1 debido a que no fue posible completar todos los datos en campo.

3.4.1.2 Análisis multivariado

Se realizó un análisis multivariado usando todas las variables morfológicas a saber: altura del fuste, DAP, sobrevivencia, diámetro de la copa, número de ramas, diámetro promedio de las ramas y longitud y ancho de las hojas. Se usó el programa Infostat versión 1.5 para agruparlas de la siguiente forma:

Análisis de Componentes Principales: este análisis se llevó a cabo con el objetivo de reducir la dimensión del conjunto de variables, a un conjunto de menor número de variables y de esta manera facilitar la interpretación de los resultados.

Análisis de conglomerados ("cluster análisis"): se construyó un dendrograma para agrupar las progenies con la distancia Euclídea y el método de agrupamiento de Ward.

3.4.2 Evaluación de datos moleculares

El análisis de los datos moleculares se llevó a cabo a partir de los resultados obtenidos de las amplificaciones del ADN de las 25 progenies de *C. alliodora*.

A partir de cada amplificación se generaron datos binarios basados en la presencia (1) o ausencia (0) de bandas, a partir de los cuales se generó una matriz binaria, la cual se introdujo en el programa estadístico Infostat versión 1.5.

A partir de la matriz binaria el programa construyó una matriz de similitud para lo que se seleccionó el coeficiente o índice de Jaccard.

Una vez que se obtuvo la matriz de similitud, las progenies fueron agrupadas en "clusters" a través de un dendrograma, usando el algoritmo de agrupamiento UPGMA (unweighed pair group method), lo cual permite visualizar en dos dimensiones las similitudes o diferencias entre las progenies estudiadas.

Con el programa Winboot fue construido un árbol de consenso, el cual señala los grupos más estables dentro del dendrograma, por el método de remuestreo o "bootstrap".

A partir de la matriz de datos binarios se llevó a cabo un Análisis de Coordenadas Principales (PCO), usando Infostat versión 1.5 y la distancia de Jaccard. Este análisis permitió visualizar las progenies en dos dimensiones, que representan en este caso las distancias genéticas entre las mismas. Sobre el gráfico obtenido se sobrepuso un Árbol de Recorrido Mínimo (ARM). Dicho árbol representa las distancias mínimas que conecta todos los vértices en el gráfico, por lo que los vértices son conectados entre ellos por la mínima distancia posible.

4. RESULTADOS

4.1 Variación encontrada entre progenies

4.1.1 Análisis de varianza

A continuación se presentan los resultados del análisis de varianza y de las pruebas de comparación múltiple para las variables analizadas.

Se encontró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las progenies para todas las variables analizadas: altura del fuste, DAP, sobrevivencia, diámetro de la rama, número de ramas, diámetro de la copa y longitud y ancho de la hoja. A continuación se presenta para cada variable los resultados obtenidos con la prueba de comparación de medias DGC.

Altura del fuste: esta variable mostró valores entre 2,16 (R5) y 9,33m (A3). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) que permitieron separar las progenies en cuatro grupos. Aunque los máximos valores fueron obtenidos para dos progenies de Antioquia, también las mínimas alturas fueron observadas en progenies de este departamento. Las progenies de Risaralda tuvieron valores intermedios, lo mismo que las dos procedencias de Costa Rica, las cuales mostraron valores muy similares (Cuadro 2).

Cuadro 2. Altura del fuste obtenidos para 23 progenies de *C. alliodora*.

PROGENIE	PROCEDENCIA	MEDIA (Altura en m)	GRUPO
R5	Risaralda	2.16	A*
A5	Antioquia	2.19	A
R4	Risaralda	2.35	A
A4	Antioquia	2.51	A
A2	Antioquia	2.84	A
V2	Valle del Cauca	3.20	A
NS1	N. de Santander	3.64	B
R6	Risaralda	3.79	B
A1	Antioquia	3.98	B
V1	Valle del Cauca	4.08	B
NS2	N. de Santander	4.51	B
R3	Risaralda	4.85	B
R7	Risaralda	5.06	B
R2	Risaralda	5.41	B
CU1	Cundinamarca	6.01	C
BL2	Costa Rica – Alajuela	6.36	C
BL1	Costa Rica – San Carlos	6.48	C
R1	Risaralda	6.73	C
T2	Tolima	7.27	C
CL1	Caldas	7.43	C
T1	Tolima	7.44	C
A6	Antioquia	8.36	D
A3	Antioquia	9.33	D

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Diámetro a la altura del pecho (DAP): Para esta variable se observaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) que permitieron separar las progenies en cuatro grupos. Los valores estuvieron entre 3,18 (V2) y 14,55cm (CL1). Los valores máximos los presentaron las progenies A3 y CL1 (Cuadro 3) y el mínimo valor la procedencia V2 del Valle del Cauca.

Cuadro 3. Diámetro a la altura del pecho de 23 progenies de *C. alliodora*.

PROGENIE	PROCEDENCIA	MEDIA (DAP en cm)	GRUPO
V2	Valle del Cauca	3.18	A*
A5	Antioquia	3.40	A
R5	Risaralda	3.67	A
A4	Antioquia	3.95	A
R4	Risaralda	4.10	A
A2	Antioquia	5.23	A
R6	Risaralda	6.23	B
A1	Antioquia	6.37	B
NS1	Norte de Santander	6.63	B
NS2	Norte de Santander	6.93	B
V1	Valle del Cauca	7.21	B
R3	Risaralda	7.36	B
R7	Risaralda	7.78	B
R2	Risaralda	7.84	B
BL2	Costa Rica – Alajuela	8.73	B
BL1	Costa Rica – San Carlos	10.36	C
T2	Tolima	10.49	C
CU1	Cundinamarca	10.86	C
R1	Risaralda	11.37	C
A6	Antioquia	11.37	C
T1	Tolima	11.90	C
A3	Antioquia	13.65	D
CL1	Caldas	14.55	D

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Sobrevivencia: la sobrevivencia de los árboles al interior de cada progenie también mostró diferencias significativas ($p \leq 0,05$), que permitieron separar las progenies en seis grupos. Para la mayoría de las progenies se obtuvo una sobrevivencia mayor al 90%. Esta variable mostró valores entre 51,14% (R7) y 100% (BL2). Las sobrevivencias más bajas las presentaron las progenies R7, R4, CU1, T2, V1 y R6 (Cuadro 4).

Cuadro 4. Supervivencia de los árboles al interior de 23 progenies de *C. alliodora*.

PROGENIES	PROCEDENCIA	MEDIAS (%)	GRUPO
R7	Risaralda	51,14	A*
R4	Risaralda	66,70	B
CU1	Cundinamarca	66,80	B
T2	Tolima	75,00	C
V1	Valle del Cauca	83,30	D
R6	Risaralda	84,33	D
A1	Antioquia	91,70	E
V2	Valle del Cauca	91,70	E
NS1	N. de Santander	91,70	E
NS2	N. de Santander	91,70	E
A2	Antioquia	91,70	E
CL1	Caldas	91,70	E
R5	Risaralda	96,42	F
A5	Antioquia	100,00	F
T1	Tolima	100,00	F
A4	Antioquia	100,00	F
A3	Antioquia	100,00	F
BL1	Costa Rica – San Carlos	100,00	F
R2	Risaralda	100,00	F
R1	Risaralda	100,00	F
A6	Antioquia	100,00	F
R3	Risaralda	100,00	F
BL2	Costa Rica - Alajuela	100,00	F

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Número de ramas: esta variable mostró valores entre 2,67 (R4) y 14,50 (R2). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) que permitieron separar las progenies en dos grupos. No se observó un patrón definido según la procedencia de los materiales. Las progenies con mayor número de ramas son V1, A5, A6, T1 y R2 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Número de ramas por árbol de 19 progenies de *C. alliodora*

PROGENIES	PROCEDENCIA	MEDIAS	GRUPO
R4	Risaralda	2,67	A*
BL2	Costa Rica – San Carlos	4,83	A
NS1	Norte de Santander	5,25	A
R3	Risaralda	6,50	A
V2	Valle del Cauca	6,83	A
T2	Tolima	6,92	A
A3	Antioquia	7,58	A
R1	Risaralda	7,75	A
NS2	Norte de Santander	7,83	A
A4	Antioquia	7,83	A
A1	Antioquia	8,83	A
BL1	Costa Rica - Alajuela	8,83	A
CL1	Caldas	9,33	A
A2	Antioquia	9,42	A
V1	Valle del Cauca	10,67	B
A5	Antioquia	10,92	B
A6	Antioquia	12,00	B
T1	Tolima	13,75	B
R2	Risaralda	14,50	B

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Diámetro promedio de las ramas: hubo diferencias significativas entre los diámetros de las ramas por progenie ($p \leq 0,05$), que permitieron separar las progenies en 5 grupos. Los valores para esta variable oscilan entre 1,43cm (V2) y 3,63cm (CL1). Las progenies que presentaron los diámetros mayores fueron A3 y CL1 (Cuadro 6).

Cuadro 6. Diámetro promedio de las ramas de 19 progenies de *C. alliodora*

PROGENIE	PROCEDENCIA	MEDIAS (cm)	GRUPO
V2	Valle del Cauca	1,43	A*
A5	Antioquia	1,51	A
A1	Antioquia	1,60	A
R4	Risaralda	1,63	A
A4	Antioquia	1,65	A
NS2	Norte de Santander	1,75	A
R3	Risaralda	1,79	A
R2	Risaralda	1,87	B
NS1	Norte de Santander	1,93	B
A2	Antioquia	1,98	B
BL2	Costa Rica - Alajuela	2,13	B
A6	Antioquia	2,18	B
T2	Tolima	2,20	B
BL1	Costa Rica – San Carlos	2,25	B
T1	Tolima	2,40	B
R1	Risaralda	2,44	B
V1	Valle del Cauca	2,56	B
A3	Antioquia	2,86	C
CL1	Caldas	3,63	D

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Diámetro de la copa: esta variable mostró valores entre 1,57 (R4) y 4,44m (CL1). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0.05$) que permitieron separar las progenies en tres grupos. No se observó ningún patrón definido según la procedencia de los materiales. Las progenies A3 y CL1 presentaron los diámetros de copa mayores (Cuadro 7).

Cuadro 7. Diámetro de las copas de 19 progenies de *C. alliodora*

PROGENIES	PROCEDENCIA	MEDIAS (cm)	GRUPOS
R4	Risaralda	1,57	A*
NS1	N. de Santander	1,94	A
V2	Valle del Cauca	1,96	A
A4	Antioquia	2,15	A
A5	Antioquia	2,35	A
BL2	Costa Rica - Alajuela	2,39	A
NS2	N. de Santander	2,49	A
A1	Antioquia	2,50	A
R3	Risaralda	2,53	A
A2	Antioquia	2,56	A
R2	Risaralda	2,84	B
V1	Valle del Cauca	3,01	B
T2	Tolima	3,03	B
BL1	Costa Rica – San Carlos	3,12	B
T1	Tolima	3,36	B
R1	Risaralda	3,47	B
A6	Antioquia	3,58	B
A3	Antioquia	4,14	C
CL1	Caldas	4,44	C

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Largo de la hoja: hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) para esta variable que permitieron separar las progenies en 5 grupos. Se presentaron valores entre 12,02cm (R3) y 18,12cm (V2). No se observó ningún patrón definido según la procedencia de los materiales. Los valores más altos los presentaron las progenies V2, A3, R2 y A1 (Cuadro 8).

Cuadro 8. Largo de la hoja de 20 progenies de *C. alliodora*.

PROGENIES	PROCEDENCIA	MEDIAS (cm)	GRUPOS
R3	Risaralda	12,02	A*
T1	Tolima	13,35	B
A2	Antioquia	13,36	B
NS1	Norte de Santander	13,44	B
BL1	Costa Rica	13,70	B
S1	Santander	14,22	C
NS2	Norte de Santander	14,64	C
CL1	Caldas	14,75	C
T2	Tolima	14,85	C
A5	Antioquia	15,03	C
R4	Risaralda	15,31	C
BL2	Costa Rica	15,43	C
A6	Antioquia	15,55	C
V1	Valle del Cauca	15,72	C
A4	Antioquia	15,79	C
R1	Risaralda	16,16	C
A1	Antioquia	16,80	D
R2	Risaralda	17,04	D
A3	Antioquia	17,32	D
V2	Valle del Cauca	18,12	E

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Ancho de la hoja: Esta variable presentó valores entre 4,47cm (BL2) y 7,45cm (A1). Hubo diferencias significativas ($p \leq 0,05$) que permitieron separar las progenies en cinco grupos. No se observó ningún patrón definido según la procedencia de los materiales. Las progenies A1 y A3 presentaron las hojas más anchas (Cuadro 9).

Cuadro 9. Ancho de la hoja de 20 progenies de *C. alliodora*.

PROGENIES	PROCEDENCIA	MEDIAS (cm)	GRUPO
BL2	Costa Rica – Alajuela	4,47	A*
R3	Risaralda	4,70	A
R2	Risaralda	5,13	B
R1	Risaralda	5,17	B
BL1	Costa Rica – San Carlos	5,28	B
NS2	Norte de Santander	5,43	B
S1	Santander	5,59	C
T1	Tolima	5,66	C
V1	Valle del Cauca	5,72	C
NS1	Norte de Santander	5,72	C
A2	Antioquia	5,72	C
T2	Tolima	5,79	C
A4	Antioquia	6,26	D
A5	Antioquia	6,33	D
CL1	Caldas	6,44	D
V2	Valle del Cauca	6,50	D
A6	Antioquia	6,54	D
R4	Risaralda	6,76	D
A3	Antioquia	7,29	E
A1	Antioquia	7,45	E

*Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

En general no se observó un patrón definido según la procedencia de los materiales evaluados. Las progenies A3, CL1 y A6 presentaron los valores promedio más altos con las variables de rendimiento (altura del fuste y DAP) y otras de las variables evaluadas (diámetro de la copa y diámetro de las ramas).

4.1.2 Análisis de Componentes Principales

Las dos primeras componentes explicaron el 58% de la variabilidad. El componente uno (CP1) el 40% y el dos (CP2) el 18% de la variabilidad.

La Figura 2 muestra los grupos formados con el análisis de componentes principales y las relaciones entre las progenies con el árbol de recorrido mínimo. Se formaron grupos muy diversos que no guardan relación con el origen de las progenies (procedencias).

Lo más relevante en este gráfico es que el componente dos (CP2) agrupa a todas las progenies de la procedencia de Antioquia sobre los cuadrantes I y II. En el componente dos (CP2) las variables con más representación son el largo y ancho de las hojas, si se comparan estos resultados con los arrojados por la prueba de comparación de medias, se puede observar que la mayoría de las progenies de Antioquia se encuentran en un mismo grupo (C), es decir que entre las progenies de Antioquia no hay diferencias significativas con estas variables. Por el contrario, las progenies de Risaralda están dispersas en todo el gráfico.

En el componente uno (CP1) las variables con mayor representación son la altura del fuste, el DAP y el diámetro de la copa. En la figura 2 se observa que las progenies con las medias mayores en la prueba de comparación de medias (T1, A6, CL1, A3, R1, T1, CU1, BL1), se encuentran separadas de las demás progenies por el CP1.

Las progenies A3 y CL1 que presentaron los valores medios más altos para la mayoría de las variables analizadas, se encuentran cercanas en este gráfico, sin embargo el árbol de recorrido mínimo no establece ninguna relación entre ellas.

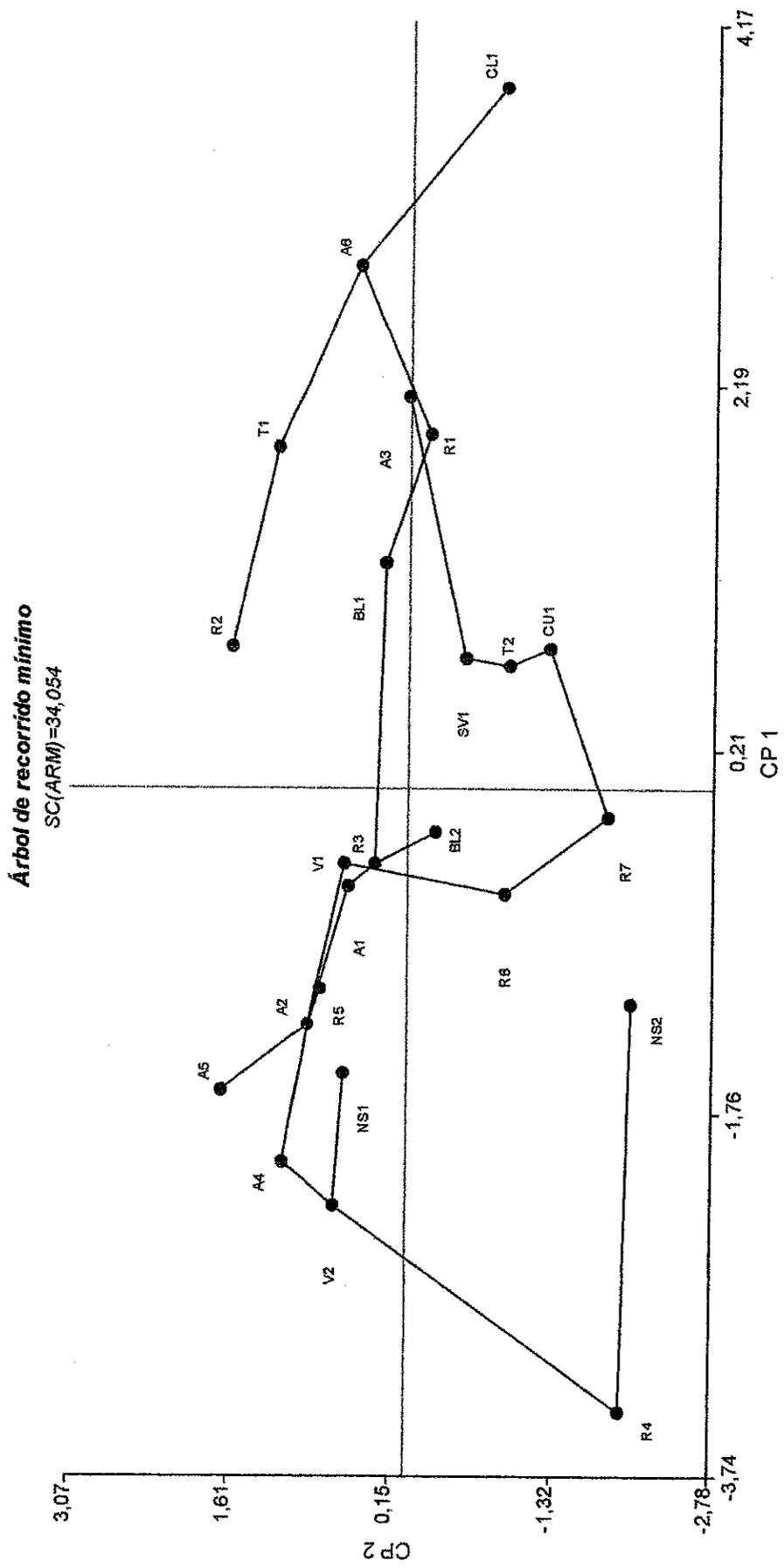


Figura 2. Análisis de Componentes Principales con los datos morfológicos de las progenies evaluadas de *C. alliodora*.

4.1.3 Análisis de conglomerados

Previo a la realización del análisis de conglomerados, se hizo una selección de variables que se incluyeron dentro de este análisis. Para esto se determinó la correlación entre pares de variables, seleccionando únicamente aquellas variables que no tenían una fuerte correlación con otras. Dado que la altura y el DAP, así como el largo y ancho de la hoja mostraron correlaciones significativas mayores de 0,8, solamente se incluyeron dentro del análisis el DAP y el largo de la hoja junto con las restantes variables.

El dendrograma a partir de los datos morfológicos se construyó con la distancia Euclídea y el método de agrupamiento de Ward. La Figura 3 muestra los grupos formados a partir de este análisis. Se formaron dos grupos, el primer grupo se separa a una distancia de 9,5. Dentro de este grupo se encuentran las progenies T1, R2, CL1, R1, A6 y A3.

Dentro del segundo grupo se forman tres subgrupos, el primero lo forman las progenies R4 y NS2 que se separan a una distancia de 7,1. El segundo subgrupo lo forman las progenies T2, SV1, BL2, R3, BL1, NS1 y A2. Y el tercer subgrupo lo forman las progenies V2, A5, A4, V1 y A1.

Con base en este análisis se puede señalar que las progenies CL1, A3 y A6 conforman un grupo, lo cual coincide con el resultado obtenido para la prueba de comparación de medias en donde estas progenies también se agruparon juntas.

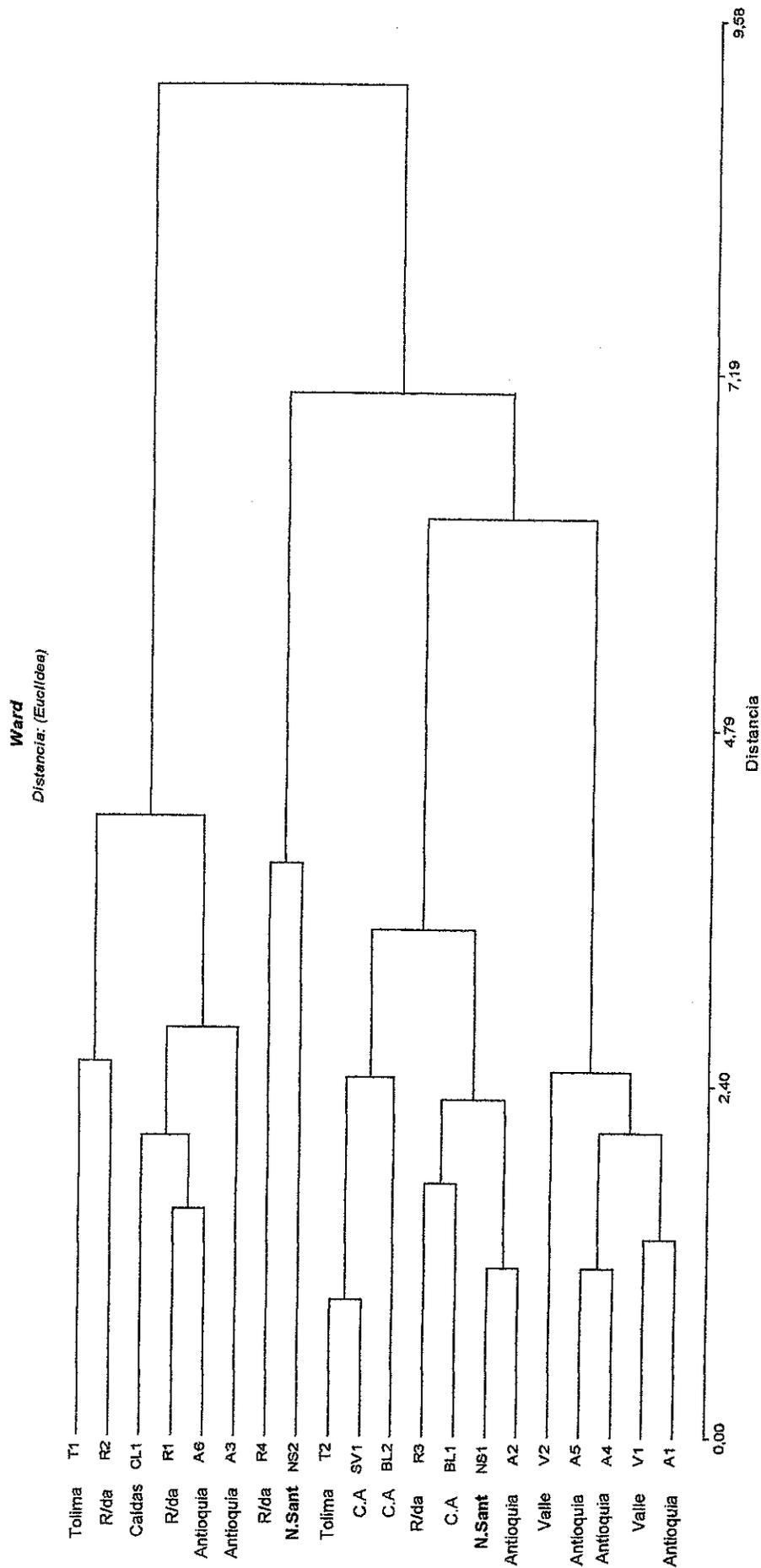


Figura 3. Dendrograma construido a partir de datos morfológicos con las progenies evaluadas de *C. alliodora*

4.2 Caracterización molecular

4.2.1 Extracción de ADN

La conservación del material vegetal a 4° C desde su colecta hasta su procesamiento en el laboratorio, favoreció en la presente investigación las extracciones de ADN, puesto que se evitó la oxidación de las muestras.

El ADN que se obtuvo con el protocolo de extracción modificado de Doyle y Doyle (1990) fue de buena calidad y en cantidades suficientes para llevar a cabo los análisis AFLPs (Figura 4). La concentración de ADN obtenida osciló entre 150 y 250ng/μl, pero fueron uniformadas en 100 ng/μl.

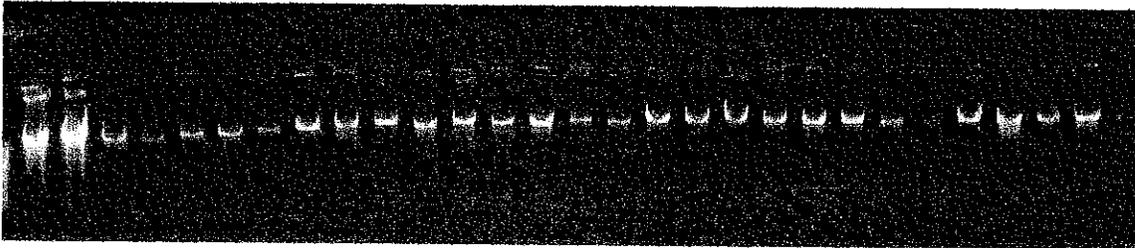


Figura 4. Determinación de la calidad y concentración de ADN de *C. alliodora* por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0,8%

4.2.2 Análisis AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms)

Con el objeto de seleccionar las combinaciones de "primers" que serían usados para evaluar las 25 progenies, inicialmente se evaluaron diez combinaciones: "E-AAC x M-CTT", "E-ACT x M-CTG", "E-ACC x M-CAA", "E-AAG x M-CAC", "E-AGC x M-CTG", "E-AAG x M-CAA", "E-AAC x M-CAG", "E-ACC x M-CAC", "E-ACT x M-CAT" y "E-AGG x M-CTC", utilizando solamente 5 progenies: R6, R3, BL1, T1 y S1; así como el control positivo que viene incluido en el "kit" (Cuadro 10).

Cuadro 10. Combinaciones de "primers" evaluados usando 5 progenies de *C. alliodora*

Combinación de "primers"	No. de bandas obtenidas
E-AAC x M-CTT	54
E-ACT x M-CTG	68
E-ACC x M-CAA	37
E-AAG x M-CAC	56
E-AGC x M-CTG	48
E-AAG x M-CAA	90
E-AAC x M-CAG	73
E-ACC x M-CAC	93
E-ACT x M-CAT	76
E-AGG x M-CTC	No hubo amplificación

De estas combinaciones se eligieron las cuatro que presentaron mayor número de polimorfismos y que tuvieron mejor calidad de bandas para realizar la caracterización. Estas combinaciones fueron: "E-ACT x M-CTG", "E-AAG x M-CAC", "E-ACC x M-CAC" y "E-ACT x M-CAT".

Las anteriores combinaciones de "primers" fueron seleccionadas por presentar el mayor número de bandas polimórficas y los patrones de bandeo más claros.

En total con estas combinaciones se obtuvieron 293 bandas de las cuales 239 fueron polimórficas, lo cual representa un polimorfismo de 81,56% (Cuadro 11). Se obtuvieron bandas que oscilaron entre 330pb y 65pb.

Cuadro 11. Combinaciones de "primers" usadas para la caracterización de *C. alliodora*.

Combinación	No. de bandas observadas	No. de bandas polimórficas	Porcentaje de polimorfismo	Rango de amplificación en pares de bases
E-AAC x M-CAC	93	72	77,4	300 -70
E-ACT x M-CAT	76	67	88,1	330 - 92
E-ACT x M-CTG	68	60	88,2	305 - 65
E-AAG x M-CAC	56	40	71,4	280 - 93
Total	293	239	81,5	

Las combinaciones más polimórficas fueron "E-ACT x M-CTG" y "E-ACT x M-CAT" con 88,2% y 88,1% respectivamente.

En algunos casos, algunas bandas fueron observadas únicamente en una o pocas progenies, tal fue el caso de las progenies V2, S1, CU1 y T1, cuando se evaluaron con la combinación "E-AAC x M-CAC". Con la combinación "E-ACT x M-CAT" las progenies S1, SV1, CL1 Y R6 presentaron también bandas exclusivas. Lo mismo se dio para las progenies BL1, A4, S1, V1 y V2 con la combinación de "primers" "E-ACT x M-CTG" y las progenies V2, SV1 y A4 con la combinación "E-AGG x M-CAC".

4.2.3. Definición de grupos genéticos

4.2.3.1 Análisis de conglomerados

El análisis de los datos moleculares se realizó con el programa estadístico Infostat versión 1.5, a través del cual se generó un dendrograma (Figura 5) con el método de agrupamiento UPGMA a partir de la matriz de similitud obtenida con el coeficiente de Jaccard. La Figura 6 muestra la agrupación de las 25 progenies evaluadas en este estudio.

Las distancias entre las progenies evaluadas se encuentran entre 0,9 y 0,4. Al realizar un corte subjetivo en el dendrograma en 0,68 es posible diferenciar cuatro progenies que claramente se separan de las demás. Estas progenies mostraron consistentemente bandas que las diferenciaron de las otras.

El primer genotipo (I) lo forma la progenie V2 que se separa de las demás progenies a 0,9. Con el método de "bootstrap" se encontró que esta es una agrupación fuerte, con un valor de 95,8%.

El segundo grupo (II) en formarse lo conforma la progenie S1 que se separa de las demás progenies con un coeficiente de 0,81. La progenie CL1 forma el siguiente grupo (III), separándose de las demás progenies a un coeficiente de 0,77. El cuarto grupo (IV) se encuentra formado por la progenie A4, separada de las demás progenies a 0,76.

La mayoría de los grupos formados en el dendrograma presentan valores "bootstrap" bajos, es decir que la probabilidad de que las progenies se agrupen en ese mismo orden es baja. Posiblemente un aumento en el número de bandas permitiría obtener un árbol más robusto.

Dentro del grupo V formado por las progenies restantes, las progenies de Norte de Santander (NS1 y NS2) son las más similares, seguidas por las progenies de Antioquia (A1, A2 y A3).

Hay un subgrupo donde se encuentran cuatro progenies provenientes de Risaralda (R3, R4, R5 y R6). La progenie R1 se agrupa con las progenies de Norte de Santander. La progenie R7 se agrupa con una progenie de Tolima (T1) y la progenie R2 se agrupa con una progenie de Antioquia (A6).

Las progenies centroamericanas (BL1, BL2 y SV1) a pesar de tener orígenes geográficos distantes con las colombianas, no se separan de estas. Al parecer las progenies centroamericanas y colombianas tienen una afinidad genética grande. Las progenies BL1 y SV1 se encuentran dentro de un mismo grupo.

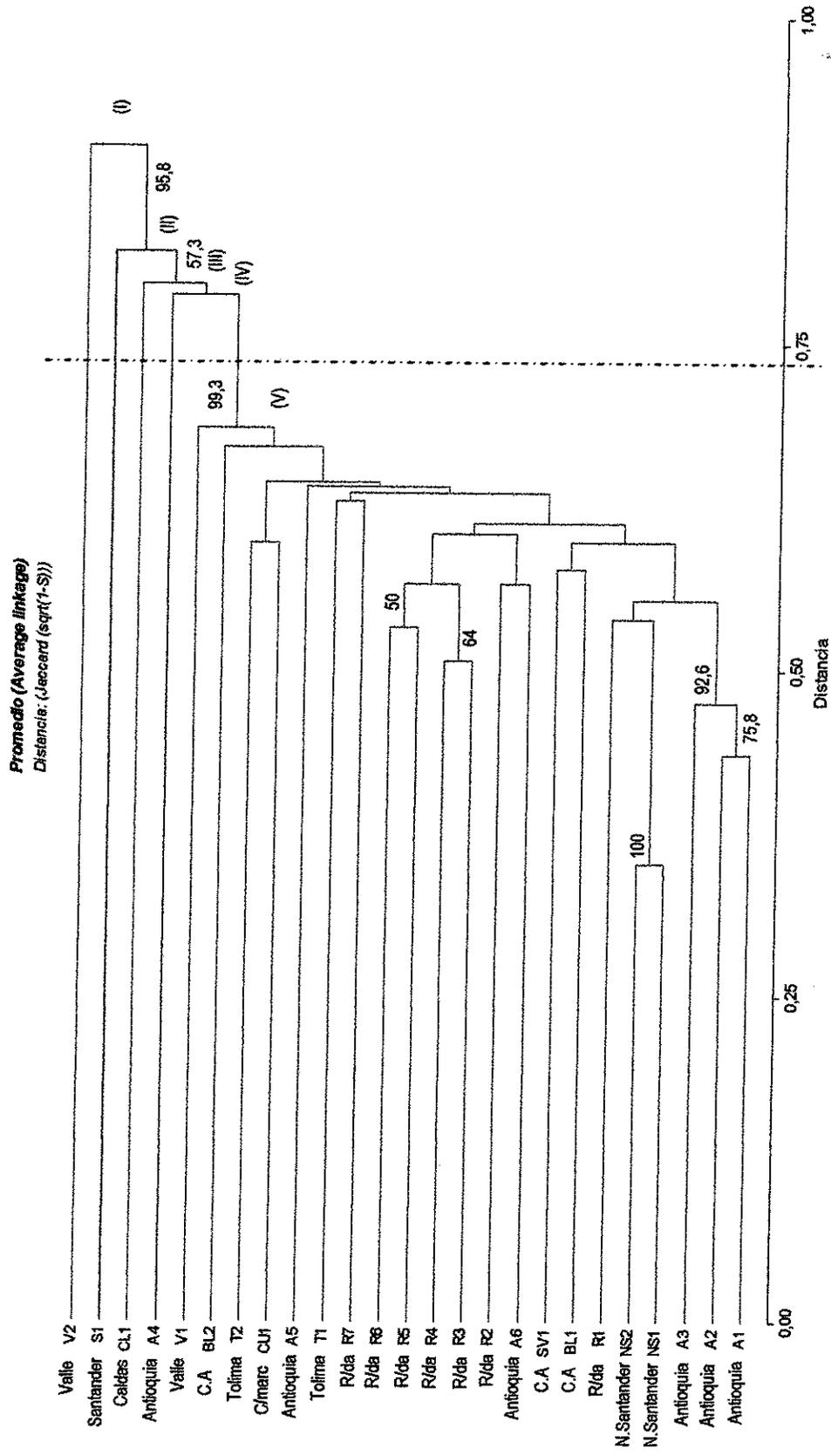


Figura 5. Dendrograma UPGMA de 25 progenies de *C. alliodora* a partir de datos moleculares

4.2.3.2 Análisis de Coordenadas Principales y Árbol de Recorrido Mínimo

En el análisis de coordenadas principales los dos primeros ejes explican 42% de la variabilidad presente entre estas progenies. El eje uno explica 30,1% y el eje dos 11,9% de la variabilidad. La coordenada 1 separa a las progenies en dos grupos, el primero constituido solo por las progenies S1, A4, V1, CL1 y V2 y el segundo por las progenies restantes.

La coordenada 2 separa a las progenies en dos grupos, el primero constituido por las progenies V2, CL1, NS1, NS2, SV1, R1, A5, A3, A2, BL2, BL1, R7 y V1, el segundo grupo constituido por las progenies restantes.

En este análisis el Árbol de Recorrido Mínimo permite visualizar de forma mas clara la relación entre las progenies evaluadas. En general se puede observar en la Figura 6 que la progenie R2 está estrechamente relacionada con otras progenies de Risaralda como R7, R3 y R6, pero además con las dos progenies del Tolima (T1 y T2), la única progenie de Cundinamarca, una progenie del Valle (V2) y una progenie de Costa Rica (BL1).

Nuevamente se separan las progenies V2, CL1, A4 y S1. Las progenies S1 y A4 se ubican en el primer cuadrante (I), sin embargo, el análisis ARM muestra que hay una mayor afinidad entre la progenie A4 y la progenie A6. La progenie S1 se conecta a las demás progenies en un nodo principal. Las progenies V2 y CL1 se ubican en el cuarto cuadrante (IV) y con el análisis ARM muestran afinidad entre ellas y a su vez con las progenies de Norte de Santander (NS1 y NS2).

En el segundo (II) cuadrante se encuentran agrupadas las progenies T2, T1, CU1, R2, A6, R5, R4, R6, R3, BL1 y A1.

En el tercer (III) cuadrante se encuentran agrupadas las progenies R7, NS1, NS2, SV1, R1, A5, A3, A2 y BL2.

Las progenies que se ubican en el primer (I) y tercer (III) cuadrante son genéticamente más distantes, al igual que las progenies que se encuentran ubicadas en el segundo (II) y cuarto cuadrante (IV).

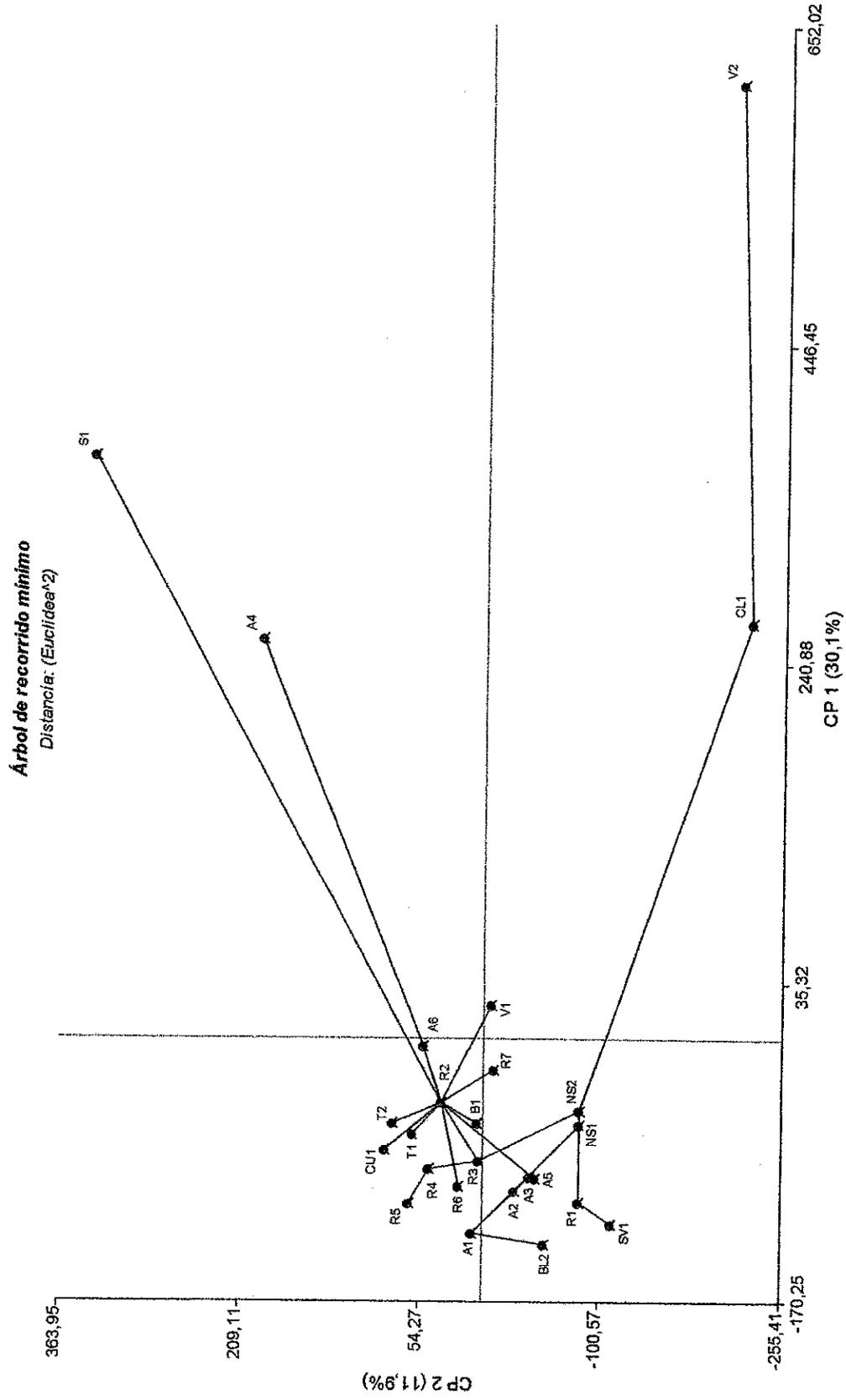


Figura 6. Análisis de Coordenadas Principales con el Árbol de Recorrido Mínimo con 25 progenies de *C. alliodora*

5. DISCUSION

Este estudio permitió obtener información valiosa sobre las características morfofisiológicas y moleculares de un grupo representativo de genotipos de *C. alliodora*. Los resultados obtenidos permitirán orientar el programa de mejoramiento genético que actualmente se desarrolla en Colombia para la selección de genotipos superiores de la especie.

En términos generales se encontró que aunque la mayoría de las descendencias estudiadas mostraron una gran afinidad genética entre sí que sugiere un alto grado de consanguinidad entre ellas, fue posible identificar genotipos que se separan significativamente de este grupo principal. Estos genotipos podrían representar acervos genéticos de *C. alliodora* que deben ser estudiados con mayor detalle y deben ser utilizados en futuros cruzamientos para explotar el vigor híbrido inherente a poblaciones genéticamente distintas. Aunque algunas variables morfofisiológicas permiten hacer una distinción entre algunos genotipos, estas no fueron suficientes para discriminar entre todas ellas, debido quizás a la fuerte influencia que tienen las condiciones ambientales en su expresión. Tampoco se obtuvo una relación clara al comparar los resultados morfofisiológicos con los moleculares lo que puede ser también reflejo de ese efecto.

Las variables morfofisiológicas evaluadas en este estudio permitieron agrupar las progenies en distintos grupos, que aunque no reflejen el origen geográfico de estas, permiten establecer cuáles progenies tienen el mayor valor en términos de rendimiento, destacándose las progenies A3, A6 y CL1. Cabe resaltar que características morfofisiológicas como la altura, DAP, diámetro de las ramas y de las copas, evaluadas en este estudio, están fuertemente influenciadas por el ambiente (Pedersen *et al.* 1993). Un estimativo más real de la variabilidad genética a través de características morfológicas podría efectuarse usando variables que sean determinadas por factores genéticos que se hereden fuertemente. Pedersen *et al.* (1993) destacan como variables de

este tipo la forma del fuste, hojas, flores, frutos y semillas. En *C. alliodora*, Johnston (1949) encontró diferencias significativas entre los domatios de árboles provenientes de la parte noroccidental de Sur América, con los de la región oriental. De igual forma, Miller (citado por Greaves y McCarter 1990) encontró diferencias en las dimensiones de características morfológicas, como el tamaño de las hojas, en especímenes de herbario colectados en México y Centro América. Los resultados de estos autores sugieren que variables como el tamaño de los domatios y de las hojas pueden ser consideradas para estimar la variabilidad entre procedencias de *C. alliodora*. En este estudio se evaluó el tamaño de las hojas e igualmente se encontraron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre las progenies evaluadas (Cuadro 9).

En un ensayo internacional de procedencias de Greaves y McCarter (1990) no reportaron diferencias significativas para la sobrevivencia de los árboles, esta fue buena hasta en los peores sitios. En este estudio la sobrevivencia mostró diferencias significativas entre las procedencias evaluadas (Cuadro 5), aunque en la mayoría de los casos la sobrevivencia fue superior al 70%.

Para un programa de mejoramiento genético forestal variables morfofisiológicas como la altura del fuste y el DAP son muy importantes, a pesar de que sean fuertemente influenciadas por factores ambientales. Sin embargo, sería importante incluir dentro de las variables a medir en *C. alliodora*, características como el tamaño de los domatios y de las hojas, que permiten tener una aproximación más cercana de la variabilidad genética de la especie.

Con base en los resultados obtenidos a partir del análisis de los datos morfofisiológicos (cuantitativos) es evidente que las progenies A3, A6 y CL1 son las mejores en términos de rendimiento (Cuadro 3 y 4) para el sitio en el que se realizaron los ensayos. De esta manera y según lo sugerido por Zobel y Talbert (1984) se esperaría que al realizar cruces controlados de individuos de estas

progenies, se obtuviera descendencias superiores, sobretodo considerando que el análisis molecular no mostró gran cercanía genética entre estas progenies. Esto aseguraría un mayor éxito, ya que de esta manera se evita la depresión por cruzamiento de individuos muy emparentados (Zobel y Talbert 1984).

Los resultados moleculares obtenidos probablemente reflejan la gran movilización de materiales genéticos de *C. alliodora* en Latinoamérica en general y en Colombia en particular, la cual se ha intensificado conforme el interés por materiales de siembra superiores ha crecido, en caso de las especies forestales (Greaves y McCarter 1990). Esto fue evidente al observar que genotipos distantes geográficamente se agruparon juntos. Así por ejemplo, las progenies centroamericanas, se agruparon con progenies procedentes de Colombia.

De igual manera los resultados moleculares indican que no existe una agrupación clara de las progenies de acuerdo a su origen geográfico, es decir que no hay mucha afinidad entre los grupos formados y su procedencia. Dentro del análisis de conglomerados (Figura 5) se encuentran separadas genéticamente progenies del mismo origen (municipio – finca) como es el caso de las progenies V1 y V2, T1 y T2 y A4 y A3. Según Mahecha y Echeverri (1983) *C. alliodora* en Colombia es nativa del litoral Pacífico, la zona del Magdalena medio y Arauca y ha sido introducida a los demás departamentos a través de reforestaciones y de los agricultores, que han llevado semilla a sus fincas para usarla en sistemas cafeteros como sombrío. Con el análisis de coordenadas principales (Figura 6) se pueden observar dos progenies muy separadas de las demás, una cuya procedencia es de Santander (Magdalena medio) y otra del Valle del Cauca (posiblemente del litoral Pacífico). Las demás progenies, en donde se encuentran representados los departamentos de Risaralda, Tolima, Cundinamarca y Antioquia, se encuentran agrupadas muy cerca. La distribución espacial en este análisis podría estar indicando los diferentes acervos genéticos de la especie en Colombia. En este caso la

progenie S1 estaría representando el acervo genético del Magdalena medio, mientras que la progenie V2 estaría representando el acervo genético del litoral Pacífico. Las progenies que están muy agrupadas y estrechamente relacionadas son una evidencia del movimiento del material genético de *C. alliodora* en el país y muy posiblemente el resultado de hibridaciones entre árboles pertenecientes a los diferentes acervos genéticos.

Además de la manipulación directa del material genético por parte del hombre, otro aspecto que podría estar influenciando en la distribución de la variabilidad genética es el comportamiento de la especie. *C. alliodora* es una especie pionera de claros de bosque y de sitios clareados para la agricultura, principalmente de polinización cruzada y su semilla es dispersada por el viento, lo cual favorece su establecimiento en sitios como la zona andina y especialmente la zona cafetera colombiana en donde la tala indiscriminada de los bosques ha sido muy intensa.

Autores como Chase *et al* (1995) y Boshier *et al* (1995) encontraron utilizando marcadores bioquímicos, una mayor variabilidad al interior de las poblaciones que entre poblaciones diferentes de *C. alliodora*, lo cual coincide con los resultados de este estudio, en donde las mayores diferencias se detectaron en algunos casos, entre progenies pertenecientes a las mismas poblaciones (procedencias) que entre progenies de diferentes poblaciones.

Sin embargo, algunas agrupaciones mostraron un resultado que fue consistente con su origen, por ejemplo, las progenies de Antioquia A1, A2 y A3 se agruparon juntas, así mismo las progenies R3, R4, R5 y R6 y las progenies NS1 y NS2. También dos progenies centroamericanas formaron un cluster, aunque pertenecen a poblaciones diferentes (El Salvador y Costa Rica).

Las progenies S1, A4, CL1 y V2 son las que más variabilidad están aportando al grupo de progenies evaluadas en este estudio. Las progenies S1 y

V2 son las que se encuentran más distantes genéticamente de las demás progenies y como se mencionó anteriormente es posible que las poblaciones originarias de estos departamentos pertenezcan a un acervo genético importante en términos de diversidad, el cual sería importante ampliar y estudiar en futuras investigaciones.

Se conoce que el género *Cordia* tiene tres áreas de gran diversidad en el geotrópico, la primera se extiende por Brasil, la segunda se extiende por México y la tercera se sitúa a lo largo de los Andes, siendo la parte septentrional, de la cual hace parte Colombia, una de las más ricas en especies (Estrada 1995). Sin embargo, este trabajo evidenció que no hay estudios de caracterización genética de *C. alliodora* en Sur América y que existe un gran potencial por explorar en Colombia. En este sentido es importante recordar que una amplia base genética y diversidad es indispensable para cualquier programa de mejoramiento genético (Cornelius 1994), pues esto permite que los materiales puedan permanecer por varias generaciones antes de ser sustituidos. También se controla el nivel de consanguinidad entre los cruces que se lleven a cabo (Murillo 1992, Vallejo 1999).

Los materiales foráneos como BL1, BL2 y SV1 no presentaron diferencias significativas con relación a los materiales colombianos, lo cual sugiere que no están aportando una variabilidad significativa a la base genética del programa de mejoramiento y que probablemente comparten un origen común.

Las diferencias observadas entre árboles de la misma especie tienen dos orígenes, el genético y el ambiental. La variabilidad fenotípica no está igualmente influenciada en todos los individuos por el genotipo (Corea 1994), lo cual permite observar generalmente en el campo una gran variabilidad entre los individuos. En este estudio los grupos formados a partir de los datos morfológicos no guardan ninguna semejanza con los grupos formados con los

datos moleculares, es decir que las variables morfológicas evaluadas no están siendo reflejadas por los marcadores moleculares usados. Greaves y McCarter (1990) señalan que las diferencias fenotípicas en *C. alliodora* no reflejan totalmente la variación genotípica y que las condiciones ambientales tienen una gran influencia modificadora en esta especie. Estos resultados además concuerdan con algunos obtenidos en estudios similares como los de Cheverud *et al* (1994), Walkman y Anderson (1998), Pfrender *et al* (2001) y más recientemente por Navarro (2002), en los cuales los marcadores moleculares no se relacionaron con las características cuantitativas evaluadas.

Características morfológicas como la altura, DAP, diámetro de las ramas y de las copas están fuertemente influenciadas por el ambiente (Pedersen *et al.* 1993) y es por esto que los marcadores moleculares pueden no reflejar la variabilidad que se presenta en este tipo de características.

También es importante resaltar que con marcadores neutros y aleatorios como es el caso de los AFLPs, la porción del genoma muestreado puede ser muy pequeña y es difícil que puedan reflejar la variabilidad que presentan las características morfológicas evaluadas.

Cornelius (1994) señala que la variación genética y ambiental se presenta al mismo tiempo y que sus efectos sobre los árboles se mezclan, por lo cual es muy importante separar los efectos del ambiente de la variación genética de los árboles. Los resultados obtenidos a partir de la evaluación de los datos morfológicos permiten reconocer la variabilidad fenotípica de las progenies, mientras que el análisis a partir de los marcadores moleculares permite reconocer la diversidad de la base genética sobre la cual está fundamentado el programa de mejoramiento genético.

Con los resultados obtenidos en este estudio se pueden realizar recomendaciones orientadas hacia el manejo del programa de mejoramiento, así como hacia la conservación de la variabilidad genética del recurso.

Teniendo en cuenta que el objetivo del programa de mejoramiento es obtener semilla certificada para la siembra en sistemas agroforestales asociados con café, donde se requiere de árboles de fustes largos y rectos, con buen diámetro y copas ralas, se sugiere que las progenies que presentan los mejores promedios para estas características sean conservadas y que los ensayos de progenies sean convertidos en huertos semilleros. Un claro ejemplo de la conversión de ensayos de procedencias – progenies a huertos semilleros de plántulas se encuentra en Mesén y Cornelius (1999). Estos autores sugieren la selección en dos pasos, eliminando inicialmente las progenies que se encuentren por debajo de la media en términos de altura y DAP. Posteriormente se procede a seleccionar al interior de cada una de las progenies los mejores árboles, con los cuales se constituye el huerto semillero.

Como se mencionó anteriormente el éxito de un programa de mejoramiento genético se basa en la diversidad genética del material, para este caso se encontró que no existe una base genética amplia, entre las progenies evaluadas. Los resultados sugieren que dentro de las poblaciones colombianas puede haber una gran diversidad genética, que no está representada en las progenies evaluadas. Cabe resaltar que el programa de mejoramiento sobre el cual se desarrolló esta investigación consta de un número mayor de progenies, muchas de las cuales no fueron evaluadas en este estudio, su futura evaluación sin duda podría ampliar la base genética conocida de *C. alliodora*. Este estudio sugiere que es importante explorar poblaciones en los tres sitios de Colombia en donde se reporta la especie como nativa, zona del Magdalena medio, litoral Pacífico y Arauca, en donde posiblemente se encuentre la mayor diversidad de la especie. Con el fin de mantener una base genética, tal como lo sugieren Zobel y Talbert (1984), de manera que las ganancias potenciales no sean

constreñidas por una reducción en la base genética o por los efectos de la depresión por cruzamiento de individuos muy emparentados.

A pesar de que los resultados obtenidos a partir de los datos morfológicos y moleculares no presenten una estrecha relación, la información generada a partir de los datos moleculares puede servir para evitar los cruces de individuos muy emparentados, evitando de esta manera una pérdida de vigor híbrido.

Los individuos provenientes de las progenies más divergentes con el análisis molecular, como es el caso de las progenies CL1, V2, S1 y A4 son candidatos útiles para establecer cruces y obtener progenies con alto valor heterocigótico, como lo señalan Wickneswari *et al.* (1996).

6. CONCLUSIONES

Las mejores progenies para características de rendimiento fueron A3, A6 y CL1, las cuales presentaron las medias más altas para altura y DAP. Se considera que estas progenies son promisorias para futuros cruces, pues además de presentar las mejores características de rendimiento, no se encuentran estrechamente relacionadas a nivel molecular, favoreciendo de esta forma la manifestación del vigor híbrido en las descendencias.

El uso de marcadores moleculares en este estudio permitió dar un enfoque hacia dos líneas en el programa de mejoramiento, una hacia el manejo y conservación del recurso genético y otra hacia los posibles cruces que garanticen que no haya una reducción en la base genética por el cruzamiento de individuos muy emparentados.

Con este estudio se pudo establecer que no hay una relación entre las características morfológicas evaluadas y los marcadores moleculares usados, las diferencias fenotípicas en *C. alliodora* no reflejan totalmente la variación genotípica, las condiciones ambientales tienen una gran influencia modificadora en esta especie.

La distribución de la variabilidad genética de *C. alliodora* en Colombia es reflejo de una gran movilización de materiales genéticos que ha ocurrido debido al potencial que tiene la especie en sistemas agroforestales, principalmente en sistemas cafeteros. Así mismo el comportamiento de la especie ha contribuido con este factor.

Las progenies S1, A4, CL1 y V2 son las que más variabilidad están aportando al grupo de progenies evaluadas en este estudio y es posible que pertenezcan a un acervo genético importante en términos de diversidad genética, el cual es importante explorar en futuras investigaciones.

Individuos de las progenies CL1, V2, S1 y A4 son candidatos útiles para establecer cruces y obtener progenies con alto valor heterocigótico.

7. RECOMENDACIONES

Es importante en la evaluación de las progenies eliminar el efecto de sitio, para lo cual se recomienda establecer parcelas con repeticiones en diferentes sitios. Una vez se haya eliminado el efecto de sitio se puede calcular a través de los datos morfológicos la heredabilidad de características de importancia económica como la altura del fuste y el DAP.

Los ensayos de progenies pueden ser convertidos en huertos semilleros de plántulas, realizando raleos de manera que se dejen en campo solo los árboles con mejores promedios en términos de altura del fuste y DAP (que son las características más importantes para este programa de mejoramiento), los cuales se convertirán en fuente de semilla certificada.

Teniendo en cuenta que en este estudio solo se evaluó una muestra de la totalidad de progenies que conforman el Ensayo de Procedencias y Progenies, se recomienda evaluar con marcadores moleculares AFLP la totalidad de las progenies que conforman el programa de mejoramiento, con el fin de conocer la verdadera base genética del programa.

Incluir en las evaluaciones de las progenies variables como el tamaño de los domatios y de las hojas, que presentan una alta heredabilidad en la especie y pueden ser consideradas para estimar la variabilidad entre procedencias de *C. alliodora*.

Este estudio sugiere que es importante explorar poblaciones en los tres sitios de Colombia en donde se reporta la especie como nativa, zona del Magdalena medio, litoral Pacífico y Arauca, en donde posiblemente se encuentre la mayor diversidad de la especie.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Applied Biostatistics, 1998. NTSYSpc. Version 2.02i.
- Bawa, K.S. 1973. Chromosome numbers of tree species of a lowland tropical community. *Journal of Arnold Arboretum* 54: 422 – 434.
- Beer, J.W., Clarkin, K.L., Salas, G., Glover, N. L. 1981. A case study of tropical agroforestry practices in a wet tropical zone, the "La Suiza" project. *In* Simposio internacional sobre las ciencias forestales y su contribución al desarrollo de la América tropical. CONICIT. San José. Costa Rica. p. 187 – 190.
- Boshier, D.H. 1992. A Study of the reproductive biology of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken. Ph.D. Thesis. Oxford. University of Oxford. 150 p.
- Boshier, D.H. y Mesén, J.F. 1986. Proyecto de mejoramiento genético de árboles del CATIE. Estado de avance y principales resultados. *In* I congreso forestal Nacional. Costa Rica
- Boshier, D.H. 1995 Incompatibility in *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. *Canadian Journal of Botany* 73: 445-456.
- _____ Chase, M.R., Bawa, K.S. 1995a. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *American Journal of Botany* 82 (4):476 – 483.
- _____ Chase, M.R., Bawa, K.S. 1995b. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 3. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany* 82 (4):484 – 490.

- _____ y Lamb, A.T. 1997. *Cordia alliodora*. Genética y mejoramiento de árboles. Tropical forestry papers No 36. Oxford Forestry Institute. 100 p.
- _____ y Hensen. 1997. Variación Genética. In *Cordia alliodora*. Genética y mejoramiento de árboles. Tropical forestry papers No 36. Oxford Forestry Institute. p 43 -70.
- Britton, D.M. 1951. Cytogenetic studies in the Boraginaceae. *Brittonia* 7: 233 – 266.
- Butcher, P. A., Glaubitz, J. C y Moran, G. F. (1999). Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales. Recursos Genéticos Forestales N° 27. FAO. Roma.
- Carson, M.J., Carson, S.D., Richardson, T.E., Walter, C., Wilcox, P.L., Burdon, R.D., Gardner, R.C. 1996. Molecular biology applications to forest trees – fact, or fiction? In: Tree improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceedings of the QFRI-UIFRO Conference. Queensland, Australia.
- Caycedo, H. Y Giraldo, F. 1988. Evaluación de procedencias de *Cordia alliodora* y *Cordia gerascanthus* en Urabá, Colombia. CONIF Informa No. 13. 9 p.
- Cenicafé (Centro Nacional de Investigaciones de Café) 2000. Ensayo de procedencias y progenies para dos especies forestales tropicales de alto valor comercial. Resultados (marzo 1996 – febrero 2000). 92 p.
- Chase, M.R., Boshier, D.H., Bawa, K.S. 1995. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 1. Genetic variation in natural populations. *American Journal of Botany* 82 (4): 468 – 475.

- Cheverud, J., Routman, E., Jaquish, C., Tardif, S., Peterson, G., Belfiore, N., Forman, L. 1994. Quantitative and molecular genetic variation in captive cotton – top tamarins (*Saguinus Oedipus*). *Conservation Biology* 8 (1): 95 – 105.
- Combe, J. Y Budowski, G. 1979. Classification of agroforestry techniques. *In* Proceedings Workshop Agroforestry systems in Latin America. CATIE. Costa Rica. 17 – 45.
- CONIF. 1983. Resumen de investigaciones sobre la especie *Cordia alliodora* (Ruíz & Pavon) Oken – “Laurel” y Actualización de las investigaciones de CONIF. CONIF informa No 2.
- Corea, E. 1994. Interacción genotipo – ambiente. *In* Manual sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE Turrialba Costa Rica. p. 1- 10.
- Cornide, M.T. 2000. Diversidad Genética y Marcadores Moleculares. Departamento de Bioplantas, CNIC. La Habana, Cuba.
- Cornide, M.T y Coto, O. 2000. Procesamiento e interpretación de la variabilidad genética. Departamento de Bioplantas, CNIC. La Habana, Cuba.
- Cornelius, J.P. 1994. Introducción al mejoramiento genético forestal. *In* Manual sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE Turrialba Costa Rica. p. 1- 10.
- Crisci, J.V., López, M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Serie de Biología. Monografía No. 26. Secretaría

general de la Organización de los Estados Americanos. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico. Washington, D.C.

Dale, G. y Chaparro, J. 1996. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. *In*: Tree improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceedings of the QFRI-UIFRO Conference. Queensland, Australia.

Doyle, J.J y Doyle J.L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.

Estrada, J. 1995. *Cordia* subgénero *Varronia* (Boraginaceae). Flora de Colombia. Universidad Nacional de Colombia - Real Jardín Botánico (Madrid) – Instituto Colombiano de Cultura Hispánica. Bogotá, Colombia. 176pp.

FAO. 1993. Conservation of genetic resources in tropical forest management. Principles and concepts. FAO forestry paper 107. Rome, Italy.

Ganders, F.R. 1979. The biology of heterostyly. *New Zealand Journal of Botany*. 17: 607-635.

Greaves, A., McCarter, P.S. 1990. *Cordia alliodora*. A promising tree for tropical agroforestry. Tropical Forestry Papers No. 22. Oxford Forestry Institute. 37p.

Johnson, P. y Morales R. 1979. A review of *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken. *Turrialba* 22 (2): 210-220.

Johnston, I.M. 1949. Studies in the boraginaceae, XVIII. Boraginaceae of the southern West Indies. *Journal of the Arnold arboretum* 30 (2) 111-138.

- Joshi, S.P., Ranjekar, P.K., Gupta, V.S. 1999. Molecular markers in plant genome analysis. *Current Science* 77 (2): 230 – 240.
- Karp, A., Kresovich, S., Bhat, K.V., Ayad, W.G., Hodgkin, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI technical bulletin No. 2. Rome, Italy.
- León, O. 1998. Marcadores moleculares: principales tipos, bases moleculares, ventajas y limitaciones. *In* Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. Eds. M. Cornide; H. Olivares; D. Planas. Habana, Cuba. p. 1-18.
- Liegel, L. H. y Stead J. W. sf. *Cordia alliodora* (Ruiz & Pav.) Oken. Laurel, Capá Prieto (en línea). Silvics Manual Vol 2. Consultado 12 ene. 2003. Disponible en http://www.na.fs.fed.us/spfo/pubs/silvics_manual/volume_2/cordia/alliodora.htm
- Mahecha, G.E., Echeverri, R. 1983. Árboles del Valle del Cauca. Realización Progreso Corporación Financiera S.A. Bogotá Colombia. 208pp.
- Marulanda, M.L., Márquez, M.P., Hernández, R.J. 2000. Selección y Caracterización de germoplasma de *Cordia alliodora* mediante marcadores moleculares RAPD, en Colombia, Sur América. *In* Memorias VII Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente y VI Seminario Internacional del Medio Ambiente y desarrollo sostenible. Cartagena, Colombia.
- Mesén, F. 1994. Ensayos de procedencias en especies forestales: establecimiento, manejo, evaluación y análisis. *In* Manual sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central.

Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE
Turrialba Costa Rica. p. 25 – 44.

Mesén, F. y Cornelius, J. 1999. Evaluación de un ensayo de procedencias –
progenies de *Vochysia guatemalensis* a los ocho años de edad, con fines
de conversión en huerto semillero. Segundo simposio sobre avances en la
producción de semillas forestales en América Latina. Coord. Rodolfo
Salazar. Santo Domingo, República Dominicana. Pg 75 – 78.

Mondino, V., Martínez Meir, A., Gallo, L. 2002. Mejoramiento genético en Pino
ponderosa y Pino oregon. CIEFAP. Patagonia Forestal. 9 (1): 6-8.

Murillo, O. 1994. Estrategias de mejoramiento genético forestal. *In* Manual
sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América
Central. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE
Turrialba Costa Rica. p. 188 – 199.

Navarro, C.M. 2002. Genetic resources of *Cedrela odorata* L. and their efficient
use in Mesoamérica. Academic dissertation in forest tree breeding.
University of Helsinki. Finland. Tesis de Doctorado.

O'Malley, D.M., Grattapaglia, D., Chaparro, J.X., Wilcox, P.L., Amerson, H.V.,
Liu, B.H., Whetten, R., McKeand, S., Kulhman, E.G., McCord, S., Crane,
B., Sederoff, R. 1996. Molecular markers, forest genetics, and tree
breeding. Genomes of plants and animals: 21st Stadler Genetics
Symposium.

Pedersen, A.P., Olesen, K., Graudal, M. 1993. Mejoramiento forestal a nivel de
especies y procedencias. *In* Mejoramiento Forestal y Conservación de
Recursos Genéticos Forestales. Tomo I. 1995. Serie Técnica Manual
Técnico No. 14. Danida Forest Seed Centre, Dinamarca. Centro

- Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba, Costa Rica. p 57 -73.
- Peláez, I. 1999. Aplicación de marcadores moleculares RAPD para evaluar el germoplasma de *Cordia alliodora* en el departamento de Risaralda. Tesis de pregrado. Bogotá. Pontificia Universidad Javeriana. 60 p.
- Pfrender, M.E., Spitze, K., Hicks, J., Morgan, K., Latta, L., Lynch, M. 2001. Lack of concordance between genetic diversity estimates at the molecular and quantitative – trait levels. *Conservation Genetics* 1: 263- 269.
- Phillips-Mora, W., Rodríguez, H. Y Fritz, P.J 1995 Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de trabajo. Unidad de Biotecnología Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE Turrialba Costa Rica. 183 p.
- Poel van der, P. 1988. *Cordia alliodora* (Ruiz & Pavon) Oken: experiencias en Colombia. Serie de documentación No 15. CFNIF. Colombia. 38 p.
- Salas, G. de las., Franco, J.M. (1978). Influencia del factor edáfico en el crecimiento inicial del laurel (*Cordia alliodora*) (R. Pav.) (Oken) en las terrazas del Río Mira, Nariño – Colombia. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal. CONIF. 48 p.
- Vallejo, A. 1999. Genetic Improvement of *Bombacopsis quinata* at Monterrey Forestal, Colombia. *Forest Genetic Resources*. FAO. No. 27: 62- 67
- Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., van de Lee, T., Hornes, M., Fritjers, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23 (21): 4407 – 4414.

- Waldmann, P., Andersson, S. 1998. Comparison of quantitative genetic variation and allozyme diversity within and between populations of *Scabiosa canescens* and *S. Columbaria*. *Heredity* 81: 79 – 86.
- Wickneswari, R., Norwati, M., Lee, S.L., Lee, C.T., Yeang, H.Y., Lokmal, N., Rasip, A.G.A. 1996. Practical uses of molecular markers in tropical tree improvement. In: *Tree improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceedings of the QFRI-UIFRO Conference. Queensland, Australia.*
- Zobel, B. y Talbert, J. 1984. *Applied forest tree improvement.* John & Wiley sons Eds. US. 505p.

9. ANEXOS

9.1 Anexo 1. Protocolo de extracción de ADN

Protocolo de extracción de ADN (Doyle & Doyle 1990 modificado)

- * Macerar en nitrógeno líquido 1,0 g de tejido fresco
- * Añadir 6 ml de buffer de extracción precalentado a 65°C
- * Incubar por 20 minutos a 65° C mezclando por inversión cada 5 minutos
- * Añadir un volumen de cloroformo, mezclar 5 minutos por inversión
- * Centrifugar 5 minutos a 13000 r.p.m
- * Remover la fase acuosa y pasar a un tubo nuevo
- * Realizar un lavado con etanol absoluto (2,5 volúmenes) mas acetato de amonio (1/10 de volumen), mezclar por inversión.
- * Incubar a -20° C durante 2 horas
- * Centrifugar a 13000 r.p.m por 5 minutos
- * Lavar el pellet con etanol al 70%
- * Centrifugar a 13000 r.p.m por 5 minutos
- * Descartar el sobrenadante
- * Secar el pellet
- * Resuspender el pellet en 150 μ l de TE
- * Agregar 2 μ l de RNasa (10mg/ml) e incubar a 37° C por 20 minutos

Buffer de extracción

3% CTAB

1,4 M NaCl

0,2% B-mercaptoetanol

20 mM EDTA

100 mM Tris

1% PVP

9.2 Anexo 2. Protocolo para AFLPs en *Cordia alliodora*

Usando el kit de Invitrogen AFLP Analysis System I.

Digestión del ADN (por cada reacción)

ECO RI/ MseI 1 μ l

Buffer 5x 2,5 μ l

Agua 6 μ l

12,5 μ l

12,5 μ l del Mix + 3 μ l de ADN (a 100ng/ μ l)

Incubar 2 hr a 37°C. Inactivar x 15 min a 70°C y poner en hielo

Ligación de adaptadores

Solución de adaptadores	12 µl
T4 DNA ligasa	0,5 µl
	12,5 µl

A cada tubo agregar 12,5 ul del mix de ligación

Incubar 2 hr a 20°C

Hacer una dilución 1:10 de la mezcla de ligación en TE

Reacción de Preamplificación

Preamp primer mix	20 µl
10X PCR buffer	2,5 µl
taq polimerasa	0,1 µl
	22,6 µl

A cada tubo agregar 22,6 µl del mix + 2,5 µl de la sin de TE adaptador con cada ADN.

Realizar la amplificación con el programa PCR+1/+1*

Verificar la amplificación en gel de agarosa al 1%

Hacer una dilución de la PCR +1 en TE.

Amplificación selectiva

Mezcla 1

ECO RI primer	0,2 µl
Mse I primer	4,5 µl
Agua	0,3 µl
	5 µl

Mezcla 2

10x PCR buffer	2 µl
taq polimerasa	0,1 µl
Agua	7,9 µl
	10 µl

Mezclar 5 µl de la mezcla 1 + 10 µl de la mezcla 2 + 5 µl de cada ADN (diluido de la PCR+1)

Correr el programa PCR+3 /+3* en el termociclador

Al finalizar almacenar a -20°C

***Programas de amplificación:**

PCR +1 /+1

94°C 30 MIN
56°C 60 seg
72°C 60 seg
20 ciclos

PCR +3/+3

94°C 30 seg
65°C 30 seg
72°C 60 seg
1 ciclo

La T° de alineamiento baja 0,7°C en cada ciclo, por 12 ciclos.

94°C 30 seg
56°C 30 seg
72°C 60 seg
25 ciclos

El amplificado se almacena a -20°C

9.3 Anexo 3. Preparación del gel de acrilamida

Preparación del vidrio de la cámara de secuenciación (Sequi – Gen GT, Bio Rad) para la tinción con plata:

Para lavar la cámara de secuenciación se usa un par de guantes y una esponja exclusiva. La cámara se lava tres veces con abundante agua y un poco de detergente (alconox). Luego se limpia con etanol al 95% para remover los restos de alconox. Después con la ayuda de toallas de papel kimwipes, se aplica una capa muy fina y uniforme de Sigmacote (Sigma, SL-2), el cual se deja secar durante cinco minutos antes de armar el aparato de corrida.

Preparación del "vidrio gel":

Reactivos

***Bind silane:**

Para un gel: 3µl de Bind silane + 1ml de Acido acético 0.5% en etanol al 95%.

Acrilamida 6%, 7,5M Urea :

Para 1L:

Acrilamida 57 g
Bis – acrilamida 3 g
TBE 10X 50 ml
Urea 450,45 g

Aforar con agua destilada a 1000ml

Filtrar la solución por 0,22 μ m y almacenar a 4°C en un frasco ambar.

Procedimiento

1. El vidrio gel se lava conalconox (con guantes y esponjas diferentes a las anteriores). Se limpia con etanol al 95% de la misma forma como se hizo con la cámara. Después se le agrega Bind silane y se distribuye por todo el vidrio usando toallas kimwipes. Se deja secar por cinco minutos.
2. Listos los dos vidrios, se arma el aparato de corrida de acuerdo a las instrucciones del fabricante y con la ayuda de una jeringa de 150 ml se sirve la acrilamida al 6%, evitando la formación de burbujas.
3. Inmediatamente se coloca el peine con el borde liso al interior de la cámara para crear el frente de corrida. La acrilamida se debe dejar polimerizando por al menos dos horas.

Electroforesis:

Reactivos

Buffer TBE 10X

Para 1L:

Tris Base 108 g

Acido Bórico 55 g

EDTA 0,5M 40 g

Completar el volumen con agua destilada.

Solución Tampón de Carga 2X (Stop Solution) (Amersham,1994)

Formamida 95%

EDTA 20Mm

Azul de Bromofenol 0.05%

Xilencianol FF 0.05%

Marcador de peso molecular 10bp:

10bp DNA	1 μ l
Agua desionizada estéril	24 μ l
Solución Stop	5 μ l

Procedimiento

1. Para la electroforesis se preparan dos litros de TBE 1X, los cuales deben ser precalentados. Al cabo de este tiempo se monta la cámara en la cubeta base y se agrega 1700 ml de TBE 1X precalentado en la cámara, y 300 ml de este buffer en la cubeta inferior. La cámara se precalienta por aproximadamente por 30 minutos hasta alcanzar 50°C. Posteriormente se retira el peine, se limpia y se coloca de nuevo con los dientes ligeramente penetrando el gel, para formar los pozos de corrida. El peine se asegura con cinta eléctrica.
2. La urea acumulada en los pozos se elimina con el buffer TBE de la cámara con ayuda de una jeringa y se sirve en algunos de ellos 3 μ l de buffer carga 2X, dejándolo precorrer por 30 minutos a 110w (o hasta que el gel alcance los 50°C). La siembra de buffer de carga se realiza para estar seguros que las muestras no se pasan de un pozo a otro.
3. El producto de la amplificación del PCR+3/+3 se diluye en 6 μ l de buffer de carga 2X. A continuación se procede a denaturarlas en el termociclador programado por 3 minutos a 92°C y se mantienen en hielo mientras se sirven 4 μ l de muestra en cada pozo, teniendo cuidado de no dejar urea acumulada en los pozos antes de servirlos. Se sirve cada 15 pozos, 4 μ l del marcador de peso molecular "10 bp". La electroforesis se deja correr a 110w por 2 1/2 horas (o hasta que el xilencianol de la solución stop alcance una distancia de 16 cm de la base de la cámara al frente de corrida).
4. Finalmente se descarta el buffer de la cámara, y se abre el aparato de tal forma que el gel quede sobre el "vidrio de gel".

**Tinción:
Reactivos**

Solución fijadora

Acido acético	350 ml
Agua bidestilada	3150 L

Solución de tinción

Nitrato de plata	3.5 g
Formaldehido 37%	4.5 ml
Agua bidestilada	3.5 l

Solución de revelado

Carbonato de sodio	105 g
Na ₂ S ₂ O ₃ 10mg/ml	650µl
Formaldehido 37%	4.5 ml
Agua bidestilada	3.5 l

Solución de parada

Acido acético	350 ml
Agua bidestilada	3150 L

Procedimiento

1. El vidrio con el gel adherido se coloca hacia arriba en una cubeta con solución fijadora durante 20 minutos. Se lava con agua desionizada durante tres minutos dos veces, con agitación constante.
2. Después el gel se introduce en la solución de tinción durante 30 minutos en la oscuridad (tapando la bandeja); el exceso de plata, se retira lavando el gel con agua desionizada por 10 segundos.
3. Una vez visualizadas las bandas, la reacción de revelado se detiene mediante la inmersión del gel en la solución de parada que debe estar en la cámara de extracción durante cinco minutos. Por último, se enjuaga el gel por 4 minutos en agua desionizada. Luego se coloca el gel sobre un soporte y se deja secar toda la noche. Posteriormente se toma la foto y se leen las bandas en un transiluminador de luz blanca.

9.4 Anexo 4. Matriz de distancias genéticas para datos moleculares, con el índice de Jaccard.

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	BL1	BL2	CLI	CU1	NS1	NS2	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	S1	SV1	T1	T2	V1	V2	
A1	0,00																									
A2	0,44	0,00																								
A3	0,48	0,47	0,00																							
A4	0,78	0,80	0,79	0,00																						
A5	0,63	0,68	0,64	0,81	0,00																					
A6	0,65	0,65	0,64	0,77	0,63	0,00																				
BL1	0,60	0,63	0,59	0,81	0,60	0,62	0,00																			
BL2	0,63	0,65	0,64	0,80	0,67	0,72	0,00																			
CU1	0,80	0,82	0,77	0,83	0,78	0,81	0,80	0,00																		
CU2	0,65	0,69	0,66	0,77	0,67	0,66	0,79	0,79	0,00																	
NS1	0,56	0,54	0,53	0,80	0,64	0,66	0,59	0,64	0,77	0,69	0,00															
NS2	0,56	0,57	0,55	0,79	0,63	0,66	0,59	0,64	0,77	0,69	0,35	0,00														
R1	0,59	0,55	0,56	0,82	0,66	0,66	0,62	0,63	0,79	0,69	0,54	0,54	0,00													
R2	0,56	0,58	0,58	0,77	0,58	0,57	0,57	0,66	0,79	0,69	0,62	0,60	0,56	0,00												
R3	0,61	0,58	0,57	0,78	0,66	0,64	0,59	0,67	0,80	0,67	0,58	0,55	0,60	0,58	0,00											
R4	0,61	0,62	0,62	0,77	0,65	0,63	0,58	0,68	0,80	0,65	0,60	0,60	0,61	0,57	0,51	0,00										
R5	0,61	0,62	0,62	0,77	0,64	0,65	0,61	0,68	0,79	0,62	0,63	0,60	0,60	0,58	0,57	0,52	0,00									
R6	0,59	0,60	0,61	0,77	0,63	0,64	0,64	0,69	0,77	0,63	0,63	0,62	0,63	0,56	0,58	0,59	0,53	0,00								
R7	0,63	0,67	0,64	0,79	0,63	0,68	0,65	0,71	0,80	0,66	0,68	0,68	0,63	0,58	0,56	0,61	0,60	0,61	0,00							
S1	0,81	0,83	0,82	0,83	0,84	0,81	0,81	0,83	0,86	0,81	0,83	0,83	0,84	0,79	0,82	0,80	0,78	0,81	0,83	0,00						
SV1	0,62	0,60	0,61	0,82	0,68	0,70	0,58	0,67	0,81	0,70	0,57	0,61	0,55	0,63	0,63	0,61	0,65	0,66	0,66	0,00	0,00					
T1	0,63	0,66	0,62	0,75	0,66	0,64	0,63	0,72	0,80	0,67	0,64	0,62	0,65	0,58	0,62	0,60	0,61	0,65	0,66	0,85	0,68	0,00				
T2	0,61	0,62	0,62	0,71	0,65	0,63	0,64	0,67	0,78	0,60	0,63	0,65	0,63	0,58	0,61	0,59	0,60	0,63	0,62	0,82	0,78	0,62	0,00			
V1	0,67	0,69	0,69	0,80	0,70	0,67	0,67	0,73	0,82	0,68	0,71	0,70	0,69	0,63	0,69	0,69	0,66	0,68	0,70	0,84	0,76	0,64	0,65	0,00		
V2	0,90	0,90	0,90	0,91	0,91	0,91	0,91	0,93	0,91	0,90	0,89	0,88	0,91	0,90	0,91	0,90	0,90	0,90	0,89	0,91	0,91	0,89	0,89	0,89	0,00	