

**ARTÍCULO CIENTÍFICO**

---

**Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP**

Emanuel Araya<sup>1</sup>  
Olman Murillo<sup>1</sup>  
Gabriel Aguilar<sup>2</sup>  
Oscar Rocha<sup>2</sup>

**Resumen**

Se utilizaron los marcadores AFLP para estudiar las relaciones genéticas de una colección de 29 clones de *Gmelina arborea* (Roxb) (melina) pertenecientes a un programa de mejoramiento genético con esta especie en la zona sur de Costa Rica. Estos clones fueron seleccionados con base en sus altos índices de crecimiento y calidad. Tres combinaciones de imprimadores (ACG/CTC, ACT/CTC y AGC/CTC) fueron utilizadas para generar los marcadores. Fueron seleccionados con base en tres umbrales de detección (75, 135 y 200) de intensidad de fluorescencia de los fragmentos. Para cada uno de los tres umbrales de detección fue calculada la distancia Euclidiana (parentezco) entre todas las posibles parejas de clones. Con los datos se generaron dendrogramas (UPGMA) y un análisis multivariado para conocer el agrupamiento de los clones (grado de parentezco). El análisis de agrupamiento permitió visualizar la separación de los clones 1, 5, 9, y 25 con respecto al resto de la colección, lo que sugiere su diferenciación genética o menor parentezco con el resto a la colección. Este resultado coincide con los obtenidos por medio del coeficiente de similitud de Jaccard, donde se obtuvo una baja relación genética entre algunos clones. Se observó que los clones 2, 4, 6, 8 y 11 están genéticamente muy relacionados entre sí, lo que sugiere cómo diseñar los subgrupos de apareamiento para la segunda generación de mejoramiento. Los valores de similitud de Jaccard más altos fueron del orden de 0,39 y registraron valores promedio para el colectivo de los 29 clones entre 0,24 y 0,27. Esto indica que la colección de clones de melina estudiada, comparte aproximadamente un poco más de un 25% de sus elementos genéticos, que podría interpretarse como su grado de parentezco o consanguinidad. Los bajos valores de diversidad genética sugieren la necesidad ampliar la base genética del programa de mejoramiento genético que se desarrolla con la especie *Gmelina arborea*.

**Palabras clave:** Similitud genética, Marcadores genéticos, Jaccard, Distancia Euclidiana, Escala multidimensional, Mejoramiento genético, Diversidad genética, *Gmelina arborea*, Costa Rica.

**Abstract**

**Genetic relationships in a clone collection of *Gmelina arborea* (Roxb) revealed with AFLP markers.** AFLP markers were used to study genetic relationships in a 29 clone collection of *Gmelina arborea* used in a tree breeding program at southern of Costa Rica. Clones were selected on the basis of their high stem quality and growth indexes. Three primer combinations (ACG/CTC,

---

<sup>1</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica. evalverde@itcr.ac.cr, omurillo@itcr.ac.cr

<sup>2</sup> Universidad de Costa Rica. gabriel1@costarricense.cr, orocha@kent.edu

ACT/CTC and AGC/CTC) were used to generate markers. Markers were selected with three different thresholds (75, 135 and 200) for the fluorescence intensity of fragments. For each threshold, Euclidean distance were calculated to generate dendrograms (UPGMA) and a multidimensional scaling was done, too. These statistical analyses allowed separation of some clones (1, 5, 9, and 25) from the remaining clones. The low value of Jaccard similarity coefficient supports this result, indicating a low genetic relationship between these clones. On the other hand, some clones were closely grouped (2, 4, 6, 8 and 11). The higher values of Jaccard similarity coefficient were around 0,39 and average values registered for the collection of 29 clones were between 0,24 and 0,27. This result indicates that 33% of genetic elements are shared between the whole collection of clones. Low values of genetic diversity suggests an extension of the genetic base used in the tree breeding program developed with *Gmelina arborea*. Criteria for AFLP analysis of melina clones and their application for tree breeding are discussed.

**Key words:** genetic similarity, Gene markers, Jaccard, Euclidean distance, genetic improvement, genetic diversity, *Gmelina arborea*.

## INTRODUCCIÓN

La melina ha cobrado gran importancia en nuestros países a medida que siguen aumentando sus posibilidades de desarrollo de nuevos productos. La versatilidad de usos que presenta actualmente su madera está generando una base industrial forestal de enorme potencial (Alfaro y de Camino, 2002), en especial si consideramos su acelerada tasa de crecimiento y productividad. Se presume que la mayor parte del material genético de esta especie existente en el país, provino de las plantaciones establecidas en 1969 en Manila de Siquirres (Lega, 1988). A finales de los años 80 el Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE) continúa con el mejoramiento genético de la melina (Mesén, 1990; Cornelius y Hernández, 1995). Con apoyo del Instituto Tecnológico de Costa Rica, el Centro Agrícola Cantonal de Hojanca, se convierte en uno de los principales proveedores de semilla seleccionada en la región centroamericana, material producido de una red de rodales semilleros (Barquero, 1987; Barrantes, 1999). A inicios de los años 90, algunas empresas reforestadoras de Costa Rica y Guatemala, desarrollaron programas de mejoramiento genético a escala comercial, estableciendo los primeros huertos semilleros en la región (Murillo, 1992; Zeaser, 1998). Estudios realizados para la región centroamericana, revelan el alto impacto económico-financiero de emprender un programa de mejoramiento con esta especie (Alfaro y Villamizar, 1998).

En programas de mejoramiento genético desarrollados en la India con esta especie, se reporta que los árboles plus superaron en un 40% (altura total), 106% (altura comercial), 66% (dap) a la población original (Kumar y Matharoo, 2003). En la zona de Palmar Sur, Osa, Puntarenas (Pacífico sur de Costa Rica), se seleccionaron 29 árboles plus los cuales han sido analizados en el presente estudio utilizando la técnica de AFLP. Estos genotipos fueron seleccionados de rebrotes de 3 años de edad, cuyas características superaron sustancialmente a la población base, lo cual refleja un enorme potencial de mejoramiento para el volumen de esta especie en el país (cuadro 1).

**Cuadro 1.** Diferencial de selección en 29 árboles plus de *Gmelina arborea* en relación con el resto de la población, en suelos aluviales de Palmar Sur, Osa, Costa Rica.

Edad (años)	Diferencia en diámetro (%)	Diferencia en volumen (%)	Diferencia en calidad (%)	IMAVol árboles plus (m <sup>3</sup> /ha)	IMAVol plantación (m <sup>3</sup> /ha)
3	19,83	54,17	54,41	91,83	59,51

Estudios realizados en la India muestran a nivel clonal, que la heredabilidad de la altura, diámetro basal y diámetro a la altura del pecho, registraron valores de 0,31, 0,44 y 0,37 respectivamente (Kumar y Matharoo, 2003). Estos valores estuvieron asociados a ganancias de un 18%, 25% y 30% para estos caracteres a los 2 años de edad. De manera importante debe mencionarse, que en esta investigación, los mejores clones en crecimiento en altura al año 2 (posiciones 1<sup>a</sup>, 2<sup>a</sup>, 4<sup>ta</sup> y 15<sup>ava</sup>), registraron las posiciones 1, 13<sup>ava</sup>, 15<sup>ava</sup> y 20<sup>ava</sup>, al año 1.

La edad de selección es de suma importancia por la posibilidad de reducir el tiempo de evaluación en el campo del material. Se ha registrado con clones de melina (Papua, 2003), que es posible seleccionar con base en la altura total a los 9 meses de edad (correlaciones desde 0,5 a 0,9 con el volumen total a los 6 años). Sin embargo, algunos caracteres cualitativos como rectitud, bifurcaciones y otros, aún podrían no haberse expresado satisfactoriamente (Osorio, 2003). Si los objetivos de producción son el papel, combustible, tarimas u otros, con turnos de rotación esperados de 5-6 años, entonces sería posible seleccionar a los 2 años. Si los objetivos de producción son plywood, madera sólida para vigas, muebles u otros usos, con turnos de rotación esperados de 10-12 años, la recomendación es de seleccionar a los 3 años de edad (Hodge y Dvorak, 2003). En generaciones avanzadas de poblaciones de mejoramiento genético con la especie, es posible lograr reducir aún más la edad de selección.

En términos de mejoramiento, la vía de producción clonal o asexual es la más indicada, dado que se logra capturar el 100% de la varianza genética (varianza aditiva y varianza no aditiva). Además permite uniformizar la plantación y disminuir los costos de manejo.

El uso de marcadores moleculares ha aumentado la eficiencia de los programas de mejoramiento, alcanzando resultados muy importantes en la búsqueda de resistencia a las plagas y enfermedades, el aumento de cosechas, las tasas de crecimiento, entre otros (Ajmone *et al*, 2001). En el caso de las especies forestales, las combinaciones de selección asistida por marcadores moleculares y ensayos de progenies, podrían permitir resultados más rápidos y exactos en la selección de caracteres complejos como la tasa de crecimiento y la calidad de la madera.

Los marcadores genéticos tienen aplicaciones importantes en programas avanzados de mejoramiento genético, especialmente en lo que se refiere a control de calidad. Las técnicas de huella genética pueden ser utilizadas para la comprobación de la identidad clonal o la contaminación de los jardines clonales y huertos (Haines, 1994). Los marcadores genéticos también juegan un papel importante en la cuantificación de la variación genética de colecciones completas. Así como el grado de parentesco dentro de las poblaciones de conservación y mejoramiento. Sin embargo, éstos pueden dar lugar a una subestimación de la variación genética en lo que respecta a caracteres (como el vigor y la calidad del fuste, que se encuentran más expuestos a la presión evolutiva, por lo que será preciso utilizarlos con precaución (Haines, 1994). Con el desarrollo y aplicación en los últimos años de los marcadores genéticos, se abre la posibilidad de utilizar la información que estos proveen como complemento o eventualmente sustitución, del protocolo de evaluación y selección fenotípica. Es por ello que se proponen en este trabajo la evaluación de la relación genética entre clones dentro de una población y la

cuantificación de la variabilidad genética de los materiales clonales de *Gmelina arborea* Roxb. (melina), entre otras aplicaciones en cuanto al mejoramiento genético.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Material vegetal y extracción de ADN**

El material vegetal fue colectado del jardín clonal de melina establecido por la Corporación Coopeagri en su finca experimental situada en Pérez Zeledón. La colección comprende 29 individuos seleccionados en la zona de Palmar Sur, Osa, Costa Rica, tomando como criterios su excepcional crecimiento y calidad (Cuadro 1). Éstos fueron clonados vía enraizamiento de rebrotes de tocón y establecidos en una colección para su posterior desarrollo comercial en el Programa de Mejoramiento Genético Forestal, que desarrolla la Corporación Coopeagri en la zona sur del país. Se tomaron hojas jóvenes de dos rametos diferentes para cada uno de los 29 clones de la colección. Las muestras fueron debidamente identificadas y llevadas al laboratorio de genética de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica. La extracción del ADN se realizó según lo descrito por Araya *et al* (2005) para las especies *Hyeronima alchorneoides* y *Tectona grandis*.

### **Reacciones de los AFLP**

Las reacciones de AFLPs se realizaron según el procedimiento descrito por Vos *et al* (1995). Las enzimas *EcoRI* y *MseI* fueron utilizadas para la restricción del ADN y T4 ADN ligasa para la ligación de los adaptadores. La amplificación preselectiva y selectiva fueron realizadas de acuerdo al protocolo adaptado y descrito por Araya *et al* (2005). Las amplificaciones selectivas evaluadas fueron ACG/CTC, ACT/CTC y AGC/CTC. Las reacciones de PCR tanto para las amplificaciones preselectivas como selectivas fueron efectuadas en un termociclador MJ Research (Gradient Cycler) ®. Los productos de la amplificación selectiva fueron desnaturalizados y los fragmentos separados en un analizador genético ABI 310 (Applied Biosystems), adicionando 0,5 µL de marcador de peso molecular GS-100-ROX para determinar el tamaño de los fragmentos.

### **Generación de datos de los AFLPs**

Los datos obtenidos del ABI 310 fueron inicialmente analizados con el programa ABI Prism® GeneScan® (Versión 3.7) y posteriormente con el programa ABI Prism® Genotyper® 3.7 NT. Los marcadores fueron codificados como presente (1) o ausente (0) para cada rameto. Se utilizaron tres umbrales de detección (75, 135 y 200) para la magnitud de la intensidad de la fluorescencia en la selección de los marcadores según las recomendaciones dadas por De Riek *et al* (1999). De esta manera se crearon tres matrices binarias de datos. Cuando se aumenta el umbral de detección para la magnitud de la intensidad de la fluorescencia, algunos marcadores podrían ser registrados como presentes en un rameto, pero como ausentes en el otro rameto del mismo clon. Para resolver este problema se revisó manualmente aquellos casos que presentaban esta inconsistencia, con el fin de garantizar una correcta selección de los marcadores. Primero se revisó la matriz binaria de los pares de rametos de cada clon y se determinó donde se presentaban inconsistencias. Posteriormente, en el programa Genotyper® 3.7 NT, se revisaron las posiciones de los marcadores para determinar si las inconsistencias se presentaban por diferencias en la intensidad de los marcadores en los pares de rametos.

### **Análisis estadísticos**

En primera instancia, se determinó la distribución de las frecuencias de los marcadores para cada uno de los tres umbrales de detección evaluados, al igual que la distribución de frecuencias de los

marcadores según su PIC (Contenido de Información Polimórfico), el cual fue calculado utilizando la siguiente fórmula:

$$PIC = 1 - [f^2 + (1 - f^2)],$$

donde “f” es la frecuencia del marcador.

La similitud entre pares de clones se determinó de acuerdo al coeficiente de similitud de Jaccard, con la siguiente fórmula:

$$S_{Jacc} = a / (a + b + c),$$

donde “a” es el número de marcadores presentes en ambos clones (A y B), “b” es el número de marcadores presentes solamente en el clon A y “c” es el número de clones presentes sólo en el clon B. Estos coeficientes fueron comparados para cada uno de los tres umbrales de detección.

Utilizando el programa Statistical Release 6, se calculó la distancia Euclidiana entre pares de clones y posteriormente se generó un dendrograma UPGMA (Unweighted Pair-Group Average), para cada uno de los tres umbrales de detección. El cálculo de la distancia Euclidiana se realizó con la siguiente fórmula:

$$D_{Eucl} = [S_m(f_{1m} - f_{2m})^2]^{1/2},$$

donde “m” es número de marcadores detectados, “f<sub>m</sub>” es la frecuencia de esos marcadores en el clon 1 y 2 respectivamente. Además del dendrograma, se realizó un análisis multivariado de ordenación denominado “multidimensional scaling”, el cual permite explicar similitudes observadas entre los elementos investigados, agrupándolos de acuerdo a la proporción de la variación que éstos muestran en el modelo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

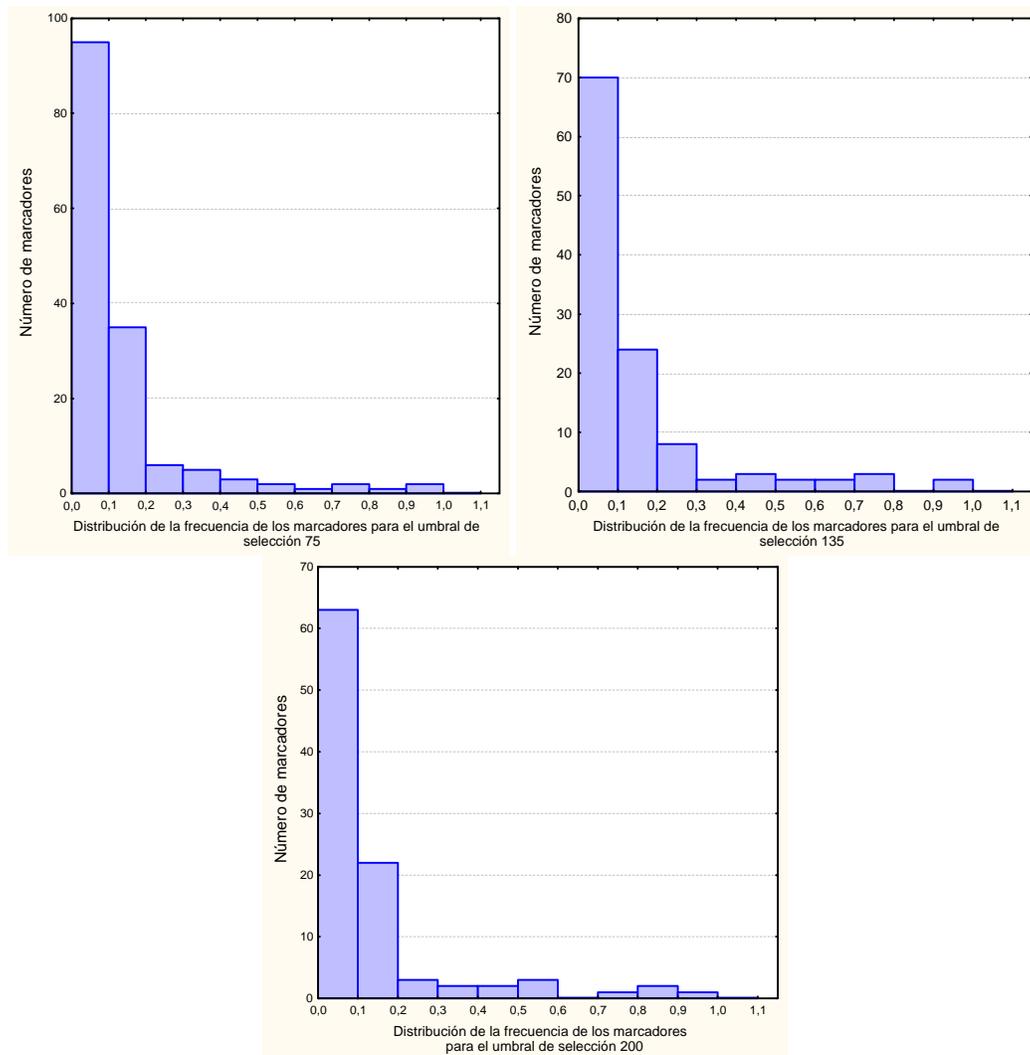
### Generación de datos de AFLPs

El número de marcadores (fragmentos) generados para cada combinación de imprimadores varió según el umbral de detección con que se seleccionaron los marcadores (Cuadro 2). El umbral mínimo de detección de los marcadores en el programa GeneScan es 50, según las especificaciones del fabricante. Este criterio ha sido utilizado para determinar los valores óptimos de selección de marcadores, sin embargo no resultó informativo (De Riek *et al.*, 1999). En el caso de melina, no se consideró este umbral de selección porque al inspeccionar manualmente los datos generados por el programa GeneScan se detectó un alto número de marcadores con intensidades cercanas a la línea base de detección (50) que podrían ser artefactos generados por la técnica de AFLPs.

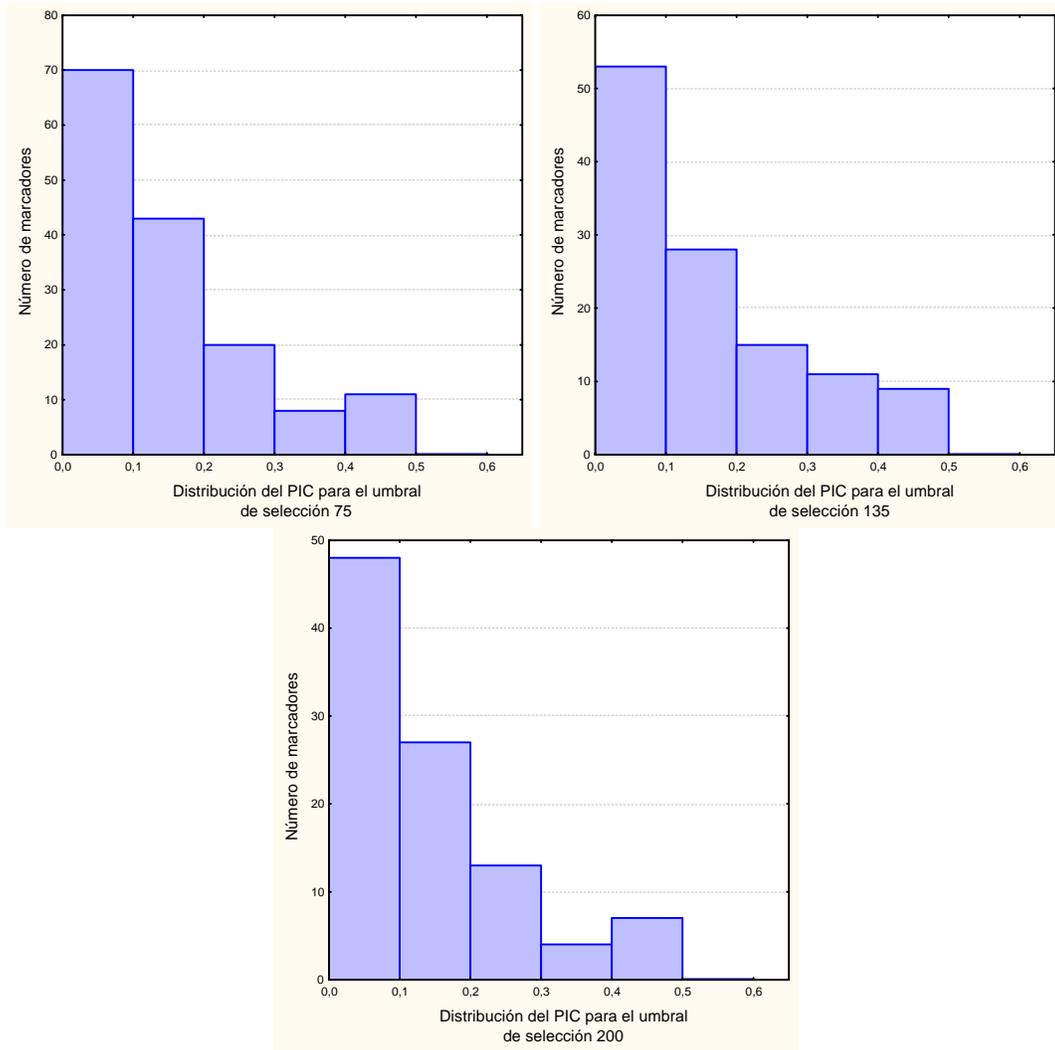
**Cuadro 2.** Número de marcadores obtenidos para las combinaciones de imprimadores evaluadas en *Gmelina arborea*, considerando tres umbrales de detección diferentes.

Umbral de detección	Combinación de imprimador			Total
	ACG/CTC	ACT/CTC	AGC/CTC	
75	33	53	73	159
135	26	47	47	120
200	26	41	32	99

La distribución de la frecuencia de aparición de los marcadores y del Contenido de Información Polimórfico (PIC) para cada uno de los umbrales de selecciones se muestra en la Figura 1 y 2. Como puede observarse, un alto número de marcadores tienen un PIC bajo, sin embargo esto permitió realizar análisis posteriores. Un comportamiento similar en el PIC de marcadores AFLP fue obtenido en un estudio para el análisis de variedades de remolacha (*Beta vulgaris*) realizado por De Riek *et al* (2001).



**Figura 1.** Distribución de las frecuencias de aparición de los marcadores detectados con tres intensidades de selección diferentes para *Gmelina arborea*.



**Figura 2.** Distribución del Contenido de Información Polimórfico (PIC) de los marcadores detectados con tres intensidades de selección diferentes para *Gmelina arborea*.

### Análisis estadísticos

El coeficiente de similitud de Jaccard fue determinado para cada uno de los tres umbrales de detección de los marcadores. Para evaluar el efecto del umbral de selección sobre este coeficiente, se determinó el promedio y la desviación estándar para los 29 clones de melina. Puede observarse en el Cuadro 3 que las variaciones en el promedio del coeficiente de Jaccard son mínimas para cada uno de los clones. El gran promedio se calculó tomando los valores del coeficiente de similitud de todos los pares de clones analizados; así como su desviación estándar. La variación en el gran promedio es mínima, no así para la desviación estándar. Siendo ésta mayor para el umbral 200. La menor desviación se presentó en el umbral 135 lo que indicaría una menor dispersión de los valores de similitud entre los clones. El gran promedio y la desviación estándar para el umbral 75 son similares al umbral 135. Este podría ser un primer criterio para establecer la utilización de un umbral de detección en el análisis de datos generados por AFLPs, sin embargo, se requieren análisis posteriores que revelen la estructura y relación genética de los clones. Por lo tanto, análisis

de conglomerados y de ordenación fueron empleados para determinar cuál es el umbral de detección que identifique los marcadores que muestren las mejores relaciones genéticas de los clones estudiados.

**Cuadro 3.** Promedio y desviación estándar del coeficiente de similitud de Jaccard para cada uno de los 29 clones de *Gmelina arborea*.

Clones	Umbral de detección					
	75		135		200	
	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.	Promedio	Desv. Est.
Clon1	0,12	0,04	0,15	0,07	0,15	0,17
Clon2	0,21	0,15	0,23	0,16	0,23	0,21
Clon3	0,28	0,13	0,30	0,10	0,30	0,18
Clon4	0,19	0,13	0,22	0,13	0,22	0,20
Clon5	0,12	0,05	0,15	0,06	0,15	0,17
Clon6	0,15	0,15	0,24	0,14	0,18	0,22
Clon7	0,32	0,18	0,29	0,13	0,34	0,22
Clon8	0,19	0,16	0,28	0,15	0,21	0,22
Clon9	0,09	0,04	0,09	0,06	0,12	0,17
Clon10	0,29	0,16	0,28	0,13	0,31	0,20
Clon11	0,19	0,15	0,23	0,16	0,22	0,21
Clon12	0,27	0,11	0,33	0,13	0,29	0,18
Clon13	0,29	0,13	0,30	0,11	0,31	0,18
Clon14	0,19	0,10	0,22	0,10	0,22	0,18
Clon15	0,16	0,05	0,12	0,05	0,19	0,16
Clon16	0,29	0,13	0,32	0,13	0,31	0,19
Clon17	0,27	0,13	0,31	0,13	0,29	0,19
Clon18	0,28	0,12	0,35	0,14	0,31	0,18
Clon19	0,30	0,15	0,37	0,14	0,32	0,20
Clon20	0,23	0,10	0,26	0,12	0,26	0,17
Clon21	0,35	0,17	0,34	0,14	0,37	0,21
Clon22	0,27	0,11	0,26	0,09	0,30	0,17
Clon23	0,35	0,19	0,33	0,15	0,37	0,22
Clon24	0,35	0,17	0,39	0,16	0,38	0,21
Clon25	0,12	0,06	0,15	0,06	0,15	0,17
Clon26	0,30	0,14	0,26	0,10	0,33	0,19
Clon27	0,35	0,18	0,25	0,10	0,37	0,21
Clon28	0,26	0,11	0,27	0,11	0,29	0,18
Clon29	0,23	0,11	0,29	0,12	0,26	0,18
<b>Gran Promedio</b>	<b>0,24</b>	<b>0,15</b>	<b>0,26</b>	<b>0,14</b>	<b>0,27</b>	<b>0,20</b>
<b>Mínimo</b>	<b>0,09</b>	<b>0,04</b>	<b>0,09</b>	<b>0,05</b>	<b>0,12</b>	<b>0,17</b>
<b>Máximo</b>	<b>0,35</b>	<b>0,19</b>	<b>0,39</b>	<b>0,16</b>	<b>0,38</b>	<b>0,22</b>

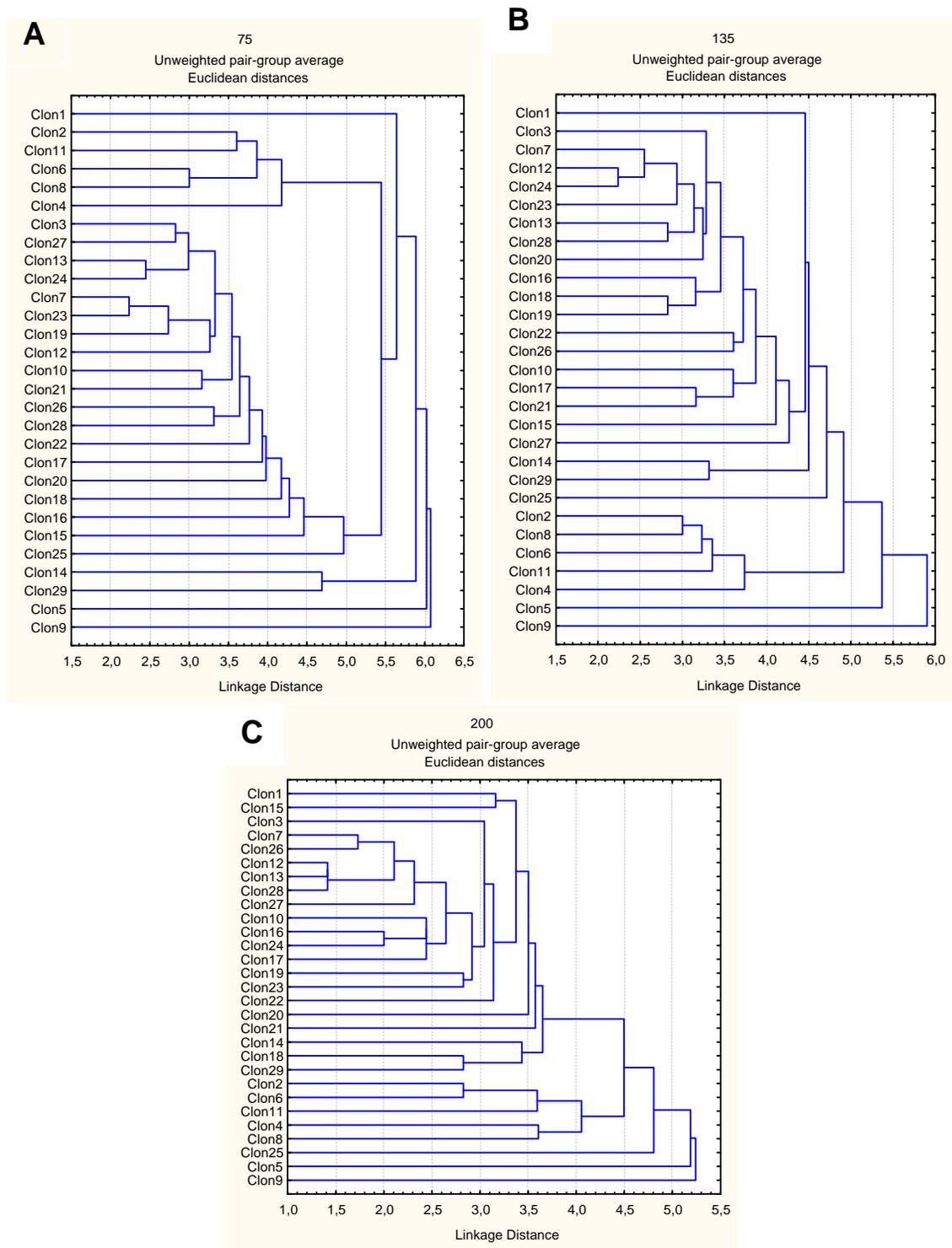
### Análisis de similitud de los clones

El agrupamiento de los clones se realizó mediante el método UPGMA (Unweighted Pair-Group Method Average) tomando como base las distancias Euclidianas. En la figura 3.A puede observarse como los clones 1, 5, 9 y 25, aparecen separados en los dendrogramas generados para el umbral 75 y 135. Este resultado coincide con lo registrado por el coeficiente de similitud de Jaccard, donde precisamente estos mismos clones presentan los valores más bajos. Lo cual indica que estos clones no tienen un parentesco fuerte con el resto de la colección. Para el umbral 200 aparecen agrupados los clones 15 y 1, por lo que pareciera que los dos primeros dendrogramas presentan más consistencia. También puede observarse cómo los clones 14 y 29 se agrupan en los dendrogramas A y B, pero en el C se agrupa el 29 con el 18, ambos separados levemente del 14. Al aumentar el umbral de selección, la similitud entre pares de clones disminuye al descartarse algunos marcadores (De Riek *et al*, 1999), que permiten agrupar los genotipos estudiados.

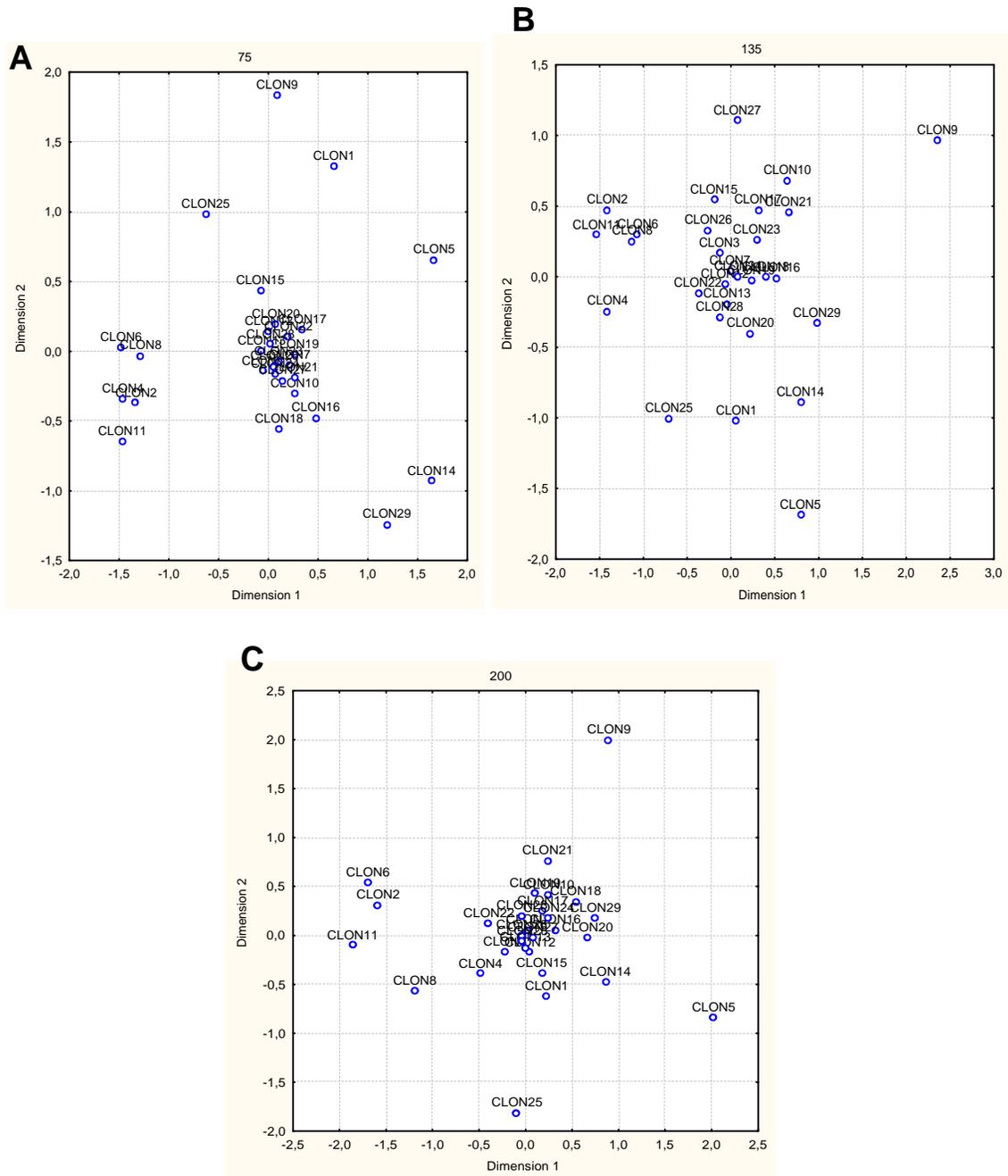
Por ejemplo, es posible que al aumentar el umbral a 200, el clon 29 tenga más marcadores en común con el clon 18 con respecto al 14. Es de particular interés el agrupamiento que forman los clones 2, 11, 6, 8 y 4, en los tres dendrogramas siendo más definido en A y B. En el análisis multivariado "multidimensional scaling" se puede también observar cómo estos clones han sido ordenados de acuerdo a su similitud (Figura 4). Este análisis de ordenación también muestra como para los umbrales 75 y 200 la mayoría de clones forman un solo conglomerado en el centro de los ejes. Posiblemente, al utilizarse un umbral de detección bajo (75), se seleccionen un alto número de marcadores que los clones comparten entre ellos. Por el contrario, al aumentarse el umbral se descartan algunos marcadores que permiten hacer una mejor separación de los clones. En este sentido, el umbral de 135 parece ser un criterio intermedio en el cual se descartan marcadores con una baja intensidad y que son compartidos entre la mayoría de clones, pero no descarta otros marcadores que permiten una mejor separación entre los genotipos de melina (Figura 4.C).

Los valores de similitud de Jaccard más altos fueron del orden de 0,39 y registraron valores promedio para el colectivo de los 29 clones entre 0,24 y 0,27. Estos valores indican que, a *grosso modo*, el nivel de similitud genética alcanzó ya un tercio. Es decir, la colección de clones de melina estudiada comparte aproximadamente un 33% de sus elementos genéticos. Puede también interpretarse como un valor de consanguinidad de 0,33 para esta colección, siendo éste muy alto. Sin embargo, al formar parte de un programa de mejoramiento genético basado en su desarrollo clonal (vegetativo) y no sexual (semilla), el riesgo de obtener material de siembra comercial altamente emparentado es sumamente bajo o casi nulo. Una vez que se logre alcanzar la fase de cruzamiento controlados para obtener la siguiente generación de mejoramiento, será vital colocar esta colección en los subgrupos sugeridos por el UPGMA, para evitar realizar cruzamientos dentro de ellos mismos. Este es el caso de los clones 2, 11, 6, 8 y 4, donde se observa claramente su agrupamiento (Figuras 3 y 4).

Los valores de diversidad genética fueron calculados de acuerdo a Gregorius (1978) para cada uno de los tres umbrales de detección (75, 135 y 200), siendo éstos 0,17, 0,15 y 0,20 respectivamente. Estos resultados sugieren la necesidad y urgencia de ampliar la base genética del programa de mejoramiento genético que desarrolla Genética Forestal (GENFORES) con la melina. Nuevas selecciones y la promoción del intercambio de material genético con otras organizaciones similares fuera del país serán estrategias básicas a seguir en los próximos años.



**Figura 3.** Agrupamiento de los 29 clones de *Gmelina arborea* utilizando las distancias Euclidianas (UPGMA). **A.** Umbral de detección 75, **B.** Umbral de detección 135 y **C.** Umbral de detección 200.



**Figura 4.** Análisis de ordenación “multidimensional scaling” de los clones de *Gmelina arborea* para los umbrales de detección 75 (A), 135 (B) y 200 (C).

## CONCLUSIÓN

Los marcadores bioquímicos y moleculares no han sido aceptados hasta el momento como medios satisfactorios para el registro de nuevas variedades vegetales, sin embargo los marcadores moleculares AFLP y los microsatélites son dos de los instrumentos más confiables y reproducibles para estudiar la información genética, en especies de plantas (Fossati *et al*, 2005). Los marcadores AFLP son cada vez más utilizados para el estudio de la diversidad genética en especies de plantas y para la caracterización de colecciones de mejoramiento de genético (Stenefon *et al*, 2003; Roldán Ruiz *et al*, 2001; De Riek *et al*, 2001; Araya *et al*, 2004). A pesar de que los AFLP son altamente reproducibles, la generación de un alto número de marcadores requiere que los criterios de selección sean consistentes de manera que se consideren los marcadores más informativos (De Riek *et al*, 1999).

En este estudio se evaluaron tres umbrales de detección de los marcadores, a partir del análisis de las muestras con el analizador genético ABI 310 (Applied Biosystems). Es importante mencionar que en la mayoría de estudios que utilizan los AFLP, no se menciona en su metodología cuáles fueron los criterios de selección utilizados para los análisis de los datos. Los análisis aquí presentados, permiten definir los primeros parámetros para el análisis mediante marcadores AFLP, no solamente para los clones de melina, sino también para el futuro estudio de la diversidad genética de poblaciones naturales y de mejoramiento de otras especies forestales, así como de colecciones de mejoramiento. Los AFLP pueden ser apropiadamente utilizados para el estudio discriminatorio de híbridos o para la evaluación de grados de similitud entre cultivares (Fossati *et al*, 2005).

Con el establecimiento de criterios de selección idóneos de los marcadores, éstos análisis podrían estar mejor representados y así, evitar la subestimación o sobreestimación cuantificables de la variabilidad genética en lo que respecta a caracteres como el vigor y la calidad del fuste, que se encuentran más expuestos a la presión evolutiva, por lo que será preciso utilizarlos con precaución (Haines, 1994). Asimismo, mismo, estos criterios permitirían generar una mejor caracterización genética de las colecciones de mejoramiento genético, para su utilización posterior en el diseño de cruces controlados.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Costa Rica – Estados Unidos de América para la Cooperación (CRUSA) y por la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ajmone Marsan, P; Gorni, C; Chitto, A; Redaelli, R; Van Vijk, R; Stam, P; Motto, M. 2001. Identification of Qtls for grain yield and grain-related traits of maize (*Zea mays* L.) using an AFLP map, different tester and cofactor analysis. *Theoretical and Applied Genetics* 102:230-243.
- Alfaro, MM; de Camino, RV. 2002. Melina (*Gmelina arborea*) in Central America. Roma, IT, FAO. Forest Resources Development Service. 18 p. (Forest Plantations Working Paper 20).
- Alfaro, M; Villamizar, M. 1998. Análisis de la oferta actual y la demanda potencial de semilla mejorada de *Tectona grandis* y *Gmelina arborea* en Costa Rica y Centroamérica. In Seminario: Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. San José, CR. sp.

- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2005. A DNA extraction protocol and initial primer screening in *Hyeronima alchorneoides* Fr. All. for AFLP applications. *Foresta Veracruzana* 7:1-4.
- Araya, E; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O. 2004. Possibilities of breeding teak (*Tectona grandis*) in Costa Rica Assisted by AFLP markers. In *Forests Genetics and Tree Breeding in the Age of Genomics-Progress and Future*. Proceedings 2004. Eds. Li, B. y Mckeand, S. Noviembre. Charleston, South Carolina, US. Disponible en: [http://www.ncsu.edu/feop/iufro\\_genetics2004/proceedings.pdf](http://www.ncsu.edu/feop/iufro_genetics2004/proceedings.pdf)
- Badilla, Y; Murillo, O; Azofeifa, M, Obando, G. 2003. Avances en reforestación clonal en Costa Rica. In IV Congreso Forestal Nacional. Setiembre del 2003. San José, CR. sp.
- Barquero, ME. 1987. Establecimiento de rodales semilleros de *Gmelina arborea* Roxb. Hojanca, Guanacaste. In Rojas, FE (ed.). Primer Taller Nacional de Semillas y Viveros Forestales. MEMORIA Noviembre, 1985, San José, CR. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago. p.p141-153.
- Barrantes, G. 1999. Comercialización de semillas en el Banco de Semillas del Centro Agrícola Cantonal de Hojanca (CACH). In Segundo simposio sobre Avances en la producción de Semillas Forestales en América Latina. Santo Domingo, RD. Octubre de 1999. p.p 243-248.
- Cornelius, J; Hernández, M. 1995. Variación genética en crecimiento y rectitud del fuste en *Gmelina arborea* en Costa Rica. *Boletín Mejoramiento Genético y Semillas Forestales* 10:9.
- De Riek, J; Calsyn, E; Everaert, I; Van Bockstaele, E; De Loose, M. 2001. AFLP based alternatives for the assessment of Distinctness, Uniformity and Stability of sugar beet varieties. *Theor. Appl. Genet.* 103:1254-1265.
- De Riek, J; Dendauw, J; Mertens, M; De Loose, M; Heursel, J; Van Blockstaele, E. 1999. Validation of criteria for the selection of AFLP markers to asses the genetic variation of a breeders's collection or evergreen azaleas. *Theor. Appl. Genet.* 99:1155-1165.
- Dvorak, WS; Hodge GR; Woodbridge, WC; Romero, JL. (CD-ROM). CAMCORE, North Carolina State University. Raleigh, NC. US.
- Fossati, T ; Zapelli, I ; Bisoffi, S ; Micheletti, A ; Vietto, L ; Sala, F ; Castiglione, S. 2005. Genetic relationships and clonal identity in a collection of commercially relevant poplar cultivars assessed by AFLP and SSR. *Tree Genetics and Genomes* 1:11-19.
- Gregorius, HR. 1978. The concept of genetic diversity and its formal relationship to heterozygosity and genetic distance. *Math. Biosciences* 41:253-271.
- Haines, RJ. 1994. La biotecnología en el mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. *Unasylyva* 45:46-52.
- Hodge, GR; Dvorak, WJ. 2003. The CAMCORE International Provenance/Progeny Trials of *Gmelina arborea*: genetic parameters and potential gain. In *Recent Advances with Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). North Carolina State University. Raleigh, NC. US. CAMCORE. CD-ROM.
- Kumar, A; Matharoo, AK. 2003. Growth performance and variability in different clones of *Gmelina arborea* in India. In *Recent Advances with Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). North Carolina State University. Raleigh, NC. US. CAMCORE. CD-ROM.
- Kumar, A; Matharoo, AK. 2003. Genetic improvement of *Gmelina arborea* in India. In *Recent Advances with Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). North Carolina State University. Raleigh, NC. US. CAMCORE. CD-ROM.

- Lega, RFF. 1988. Estudio de la forma de *Gmelina arborea* Roxb. Análisis de las plantaciones de Manila, Siquirres. M.Sc. Tesis. Turrialba, CR, CATIE. 146 p.
- Mesén, F. 1990. Resultados de ensayos de procedencias en Costa Rica. Turrialba, CATIE. Serie Técnica. Informe Técnico No. 156.
- Murillo, O. 1992. Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica. Tecnología en Marcha 11 (3): 51-58 p.
- Murillo, O; Obando, G; Badilla, Y; Azofeifa, M. 2003. Creación de GENFORES, una cooperativa de mejoramiento genético forestal en Costa Rica. In IV Congreso Forestal Nacional. Setiembre del 2003. San José, CR. sp.
- Osorio, L. 2003. Provenance results of *Gmelina arborea* in southwest Colombia at three years of age. In Recent Advances with *Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). North Carolina State University. Raleigh, NC. US. CAMCORE. CD-ROM.
- Papua, F. 2003. Juvenile selection of *Gmelina arborea* clones in the Philippines. In Recent Advances with *Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). North Carolina State University. Raleigh, NC. US. CAMCORE. CD-ROM.
- Roldán-Ruiz, I; van Eewijk, FA; Gilliland, TJ; Dubreuil, P; Dillman, C; Lallemand, J; De Loose, M; Baril, CP. 2001. A comparative study of molecular and morphological methods of describing relationships between perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) varieties. Theor. Appl. Genet. 103:1138-1150.
- Stenefon, VM; Nodari, RM; dos Reis, MS. 2003. Padronização de protocolo AFLP e sua capacidade informativa para análise da diversidade genética em *Araucaria angustifolia*. Scientia Forestalis 64:163-171.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Vandele, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M; Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acid Research 23:4407-4414.
- Zeaser, D. 1998. Programa de mejoramiento genético de la Ston Forestal en la zona sur de Costa Rica. In Seminario: Aumento de la rentabilidad de las plantaciones forestales: un reto ligado al uso de semilla de alta calidad. San José, CR. Mayo de 1998. sp.