

NOTA TÉCNICA

Uso de marcadores genéticos en silvicultura clonal

Emanuel Araya¹
Olman Murillo¹
Gabriel Aguilar²
Oscar Rocha²

Resumen

Como parte del proyecto Mejoramiento Genético Forestal Asistido por Marcadores Genéticos (Instituto Tecnológico de Costa Rica y Universidad de Costa Rica, financiado por la Fundación CRUSA), se han desarrollado aplicaciones en el programa de mejoramiento genético de especies forestales como teca, melina y pilón. Con la utilización de diez microsatélites se ha podido generar una huella genética para cada uno de los clones de teca de la colección del Instituto Tecnológico de Costa Rica y FUNDECOR. Se ha podido verificar la veracidad y pureza de cada uno de los clones, así como el grado de parentesco utilizando microsatélites, donde se registraron casos de un 90% de similitud genética entre algunos pares de clones. Así también, se determinó que algunos clones comparten poca información genética (menor al 20%). Con base en muestras de teca de familias contrastantes en un ensayo de progenie, se investigó posible ADN presente solamente en los individuos superiores en volumen y calidad de fuste. Se analizaron mediante AFLPs las dos mejores y las dos peores familias del ensayo con respecto a su producción volumétrica y calidad de fuste. Para la variable calidad, las mejores familias comparten un alto porcentaje de sus elementos genéticos. Se observó que las mejores familias se separan ampliamente de las peores, posibilitando con esta evidencia, continuar profundizando en el ADN que aparece exclusivamente en los mejores materiales del programa. Se incluye la aplicación de los marcadores genéticos como un potencial complemento del protocolo de evaluación de los materiales utilizados en ensayos de progenie y colecciones genéticas establecidas en el Programa de Conservación y Mejoramiento Forestal que desarrolla el Instituto Tecnológico de Costa Rica en conjunto con miembros de GENFORES.

Palabras clave: Mejoramiento genético forestal, Microsatélites, Colección de clones, Huella genética, ADN, AFLPs, Ensayos de progenie.

Abstract

The use of genetic markers in clonal forestry. As part of the Tree Improvement Assisted by Gene Markers project (Instituto Tecnológico de Costa Rica, University of Costa Rica, financed by the CRUSA foundation), applications in the program of genetic improvement of tree species such as teak, melina and pilón have been developed. The use of ten

¹ Instituto Tecnológico de Costa Rica. evalverde@itcr.ac.cr. olmuga@yahoo.es

² Universidad de Costa Rica. gabriel1@costarricense.cr; orocha@kent.edu

microsatellites has generated the fingerprinting for each of the teak clones within the Instituto Tecnológico de Costa Rica and FUNDECOR collection. Also using microsatellites, it has been possible to confirm the veracity and purity of each of the clones, as well as the degree of kinship, whereby cases with a 90% genetic similarity were registered among some clone pairwise. Additionally, it was determined that some clones share little genetic information (less than 20%). Based on teak samples from contrasting families, a progeny test was used to investigate possible DNA presence only in individuals with greater volume and stem quality. The best two and the worst two families for volumetric production and stem quality were analysed with AFLP markers. For the quality trait, the best families share a high percentage of their genetic elements. It was observed that the best families are widely separated from the worst ones, this evidence making an in depth analysis of the DNA found exclusively within the best plant material in the program. The application of genetic markers is included, as a potential complement to the evaluation protocol for materials used in progeny tests and genetic collections established within the Genetic Tree Improvement and Conservation Program that the Instituto Tecnológico de Costa Rica is developing together with members of GENFORES.

Key words: Tree breeding, Microsatellites, Clone collection, Fingerprinting, DNA, AFLP, Progeny tests

INTRODUCCIÓN

Los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de marcadores genéticos que han sido utilizados como instrumento de múltiples aplicaciones y gran porvenir en la conservación y el mejoramiento genético de especies forestales. Un marcador genético puede definirse como un gen, cuya expresión fenotípica se puede discernir y puede ser utilizado para identificar a un individuo o una célula que contiene un determinado genotipo (King y Stansfield, 1990); este genotipo puede presentar variaciones o diferencias (polimorfismos) entre organismos de una misma especie. Estas diferencias resultan de cambios o rearrreglos entre los elementos que conforman el ADN. Los marcadores genéticos detectan variaciones directas a nivel del ADN, identifican individuos dominantes y codominantes y no están sujetos al ambiente donde se desarrollan los organismos en estudio (Valadez y Kahl, 2000).

El uso los de marcadores moleculares ha aumentado la eficiencia de los programas de mejoramiento forestal, alcanzando resultados muy importantes en la búsqueda de resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, aumento de cosechas, 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. Tradicionalmente en mejoramiento genético forestal, los plazos de evaluación y verificación del material seleccionado (árboles plus) requieren de al menos medio ciclo de rotación del cultivo, es decir, de ensayos genéticos no menos de 8–10 años en el campo. Estos ensayos sin embargo, se basan exclusivamente en la expresión fenotípica del individuo. Por lo tanto, no es posible saber si los individuos que se seleccionan y se aceptan en un programa de mejoramiento poseen el genotipo deseado. Esta situación es una de las principales causas de la disminución en las ganancias genéticas esperadas y hace que los resultados del mejoramiento genético sean más lentos (Araya *et al*, 2003).

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 digital” pueden ser utilizadas para la comprobación, ya sea de la identidad clonal o la contaminación de los jardines clonales y huertos (Haines, 1994). En *Quercus robur* y *Q. petraea* los

marcadores genéticos AFLPs y microsatélites han demostrado ser más útiles, comparados con los análisis morfológicos, en estudios de identidad de clones (Bakker *et al*, 2001). En teca (*Tectona grandis* L.f.) se ha utilizado la técnica de RAPD para estudiar el manejo de clones, permitiendo desarrollar una metodología para discriminar entre clones de árboles plus (Watanabe *et al*, 2004). En teca, también se ha comprobado la utilización de los RAPD para medir la relación genética entre clones (Norwati *et al*, 1999). Sin embargo, la técnica de RAPD tiene problemas en su reproducibilidad y podrían darse errores al momento de hacer la discriminación entre clones. Para contrarrestar el riesgo de la reproducibilidad de la técnica, se han desarrollado los marcadores SCAR (Sequence Characterized Amplified Region), los cuales demostraron ser reproducibles y confiables para la discriminación e identificación de clones de *T. grandis* (Isoda *et al*, 2000). También se han realizado estudios isoenzimáticos para medir la variación genética entre procedencias de *Tectona grandis* (Kertadikara y Prat, 1995) y entre razas en diferentes localidades (Kjæer y Siegismund, 1996).

Los marcadores genéticos también juegan un papel importante en la cuantificación de la variación genética de colecciones completas de ensayos genéticos; 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 proveen como complemento o eventualmente sustitución, del protocolo de evaluación y selección fenotípica, entre otras aplicaciones del mejoramiento genético forestal. Con el presente trabajo se propone: la verificación de la identidad genética del material en evaluación, la cuantificación de la variabilidad genética de los materiales, la evaluación de la relación genética entre clones dentro de una población, el aseguramiento ante usurpación de material genético y a futuro, la selección temprana.

CLASIFICACIÓN DE LOS MARCADORES GENÉTICOS

Los marcadores genéticos pueden dividirse en tres clases: los marcadores morfológicos, los marcadores bioquímicos y los marcadores basados en ADN o moleculares; los dos últimos han sido los más utilizados en estudios de mejoramiento genético forestal. Los marcadores bioquímicos pueden ser compuestos orgánicos de los organismos (por ejemplo terpenos, alcaloides, etc.) o bien, pueden ser proteínas (isoenzimas), las cuales son las más ampliamente utilizadas en estudios de especies forestales. Los marcadores bioquímicos examinan los productos de los genes. Este análisis puede complicarse por efectos de la expresión génica, epistasis (interacción con otros genes) y redundancia del código genético. El surgimiento de las enzimas de restricción y de la tecnología de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR por sus siglas en inglés), ha permitido investigar a los organismos a través del ADN (Glaubitz y Moran, 2000).

Los marcadores genéticos de mayor utilización y desarrollo en los últimos años han sido:

- a. las isoenzimas (que trabajan a partir de isoenzimas),
- b. los marcadores basados en el ADN, entre los más conocidos están RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y los microsatélites o SSR (Simple Sequences Repeats).

En el Cuadro 1 se resume sus principales características y diferencias.

Cuadro 1. Comparación de marcadores genéticos comúnmente utilizados en genética forestal*.

	Variables generales				
	Isoenzimas	RFLP	SSR	RAPD	AFLP
Número de fragmentos obtenidos	1-10	100s	10s	100s	1000s
Grado de polimorfismo	Bajo a moderado	Moderado a alto	Muy alto	Moderado a alto	Moderado a alto
Dominancia	Codominante	Codominante	Codominante	Dominante	Dominante
Transferencia de los fragmentos obtenidos	Entre familias	Entre géneros relacionados	Dentro de subgéneros	Dentro de especies	Dentro de especies
Reproducibilidad	Muy alta	Muy alta	Alta	Baja a medio	Media a alta
Facilidad de ensayar	Fácil	Difícil	Fácil a moderado	Fácil a moderado	Moderadamente difícil
Costos					
Equipo	Medio	Alto	Medio	Medio	Medio
Desarrollo	Bajo	Alto	Muy alto	Moderado	Alto
Ensayo o aplicación	Bajo	Alto	Medio	Medio	Medio

* Adaptado y modificado de Glaubitz y Moran (2000)

DESARROLLO DE APLICACIONES DE MARCADORES GENÉTICOS EN LOS PROGRAMAS CLONALES DE GENÉTICA FORESTAL (GENFORES)

La utilización de los marcadores genéticos, como asistentes en la selección de individuos en programas de mejoramiento genético forestal, tiene poca trayectoria en el ámbito nacional. Desde el año 2003 se inició el proyecto “Mejoramiento genético forestal asistido por marcadores genéticos”, en un esfuerzo conjunto entre el Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y la Universidad de Costa Rica (UCR) con el financiamiento de la Fundación Costa Rica – Estados Unidos de América para la Cooperación (CRUSA). Se ha utilizado como plataforma una serie de ensayos de progenie y programas de mejoramiento establecidos, como parte del Programa de Conservación y Mejoramiento Forestal que realiza el ITCR. Este Programa tiene como objetivo apoyar el mejoramiento genético de poblaciones forestales de las organizaciones integrantes de Genética Forestal (GENFORES). Además, es un programa permanente de vinculación académica con el sector productivo nacional y la Escuela de Ingeniería Forestal del ITCR, el cual tiene la responsabilidad del desarrollo científico en genética forestal.

Verificación de la pureza de los jardines clonales y ensayos genéticos

Entre los distintos marcadores genéticos disponibles es importante mencionar los AFLP como marcadores dominantes, que permiten evaluar la variación genética en todo el genoma de las plantas. Estos permiten establecer una matriz de datos binomial (0/1), en la cual el cero significa la ausencia y el 1 la presencia de un determinado fragmento de ADN dentro del genoma (Figura 1). El protocolo para el análisis de la especie *Hyeronima alchorneoides* (pilón) fue recientemente establecido (Araya *et al*, 2005), lo que ha permitido el análisis completo de la colección de clones de esta especie. De manera similar se ha analizado la colección de clones de *Gmelina arborea* (melina) de la Corporación Coopeagri (29 clones), como organización integrante de GENFORES.

Inicialmente se pretendía con los AFLP realizar una comprobación de la pureza de los jardines; sin embargo, esta técnica puede generar inconsistencias en los patrones genéticos entre individuos (rametos) de un mismo clon. La matriz binomial es generada a partir de una serie de criterios para la selección de los marcadores AFLP. Sin embargo, estos criterios no están estandarizados, representando un alto grado de subjetividad al momento de seleccionarlos.

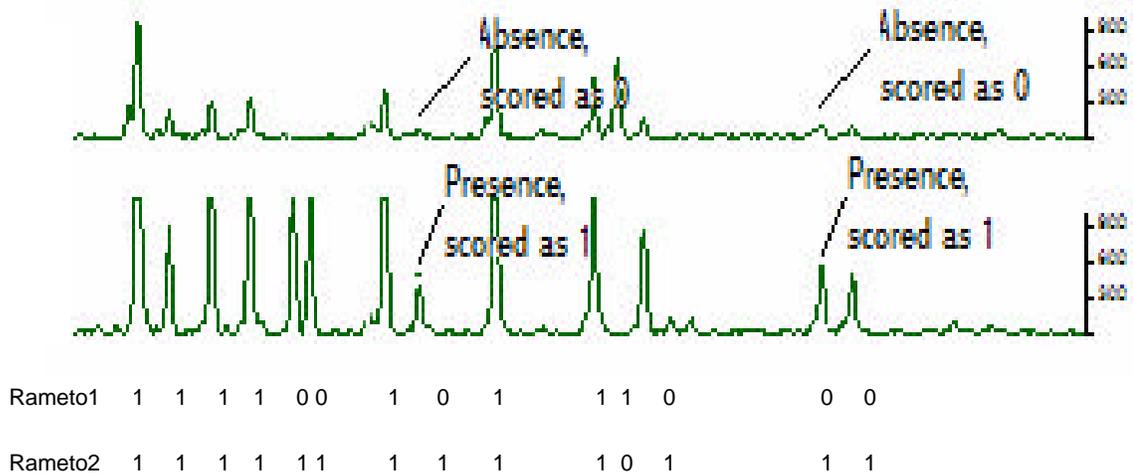


Figura 1. Presencia o ausencia de fragmentos de ADN (picos) en dos individuos analizados con la técnica de AFLP.

En el Cuadro 2 puede observarse el resultado de la salida de un secuenciador en la lectura de un fragmento de ADN de dos individuos de un mismo clon de melina. Utilizando tres criterios de magnitud (50, 120 y 300) en la expresión de los picos (1) y valles (0) para un imprimador, se puede observar como se registran lecturas inconsistentes en el patrón genético entre dos rametos.

Cuadro 2. Diferencias en los patrones genéticos entre dos rametos de un mismo clon de *Gmelina arborea* utilizando tres magnitudes de expresión de los picos al utilizar un imprimador, generados con la técnica de AFLP.

Magnitud del pico		Individuo	
		1	2
>50	Pico 1	1	1
	Pico 2	1	1
	Pico 3	1	1
	Pico 4	0	1
	Pico 5	0	1
	Pico 6	0	1
>120	Pico 1	1	1
	Pico 2	0	0
	Pico 3	1	1
	Pico 4	0	1
	Pico 5	0	0
	Pico 6	1	0
>300	Pico 1	1	0
	Pico 2	0	0
	Pico 3	1	0
	Pico 4	1	1
	Pico 5	0	0
	Pico 6	0	1

En estudios similares realizados con dos especies *Quercus* no se especifican los criterios utilizados para hacer la identificación de clones (Bakker *et al*, 2001). Para evaluar colecciones de material base mediante los AFLP se podría seguir la metodología descrita por De Riek *et al* (1999), en la cual se validaron los criterios para la selección de marcadores AFLP, para luego investigar la variación genética en colecciones de *Rhododendron sinsii*. No obstante, los AFLP son un tipo de marcador que permite obtener una gran cantidad de fragmentos de ADN (picos) con un grado de variación o polimorfismo alto (Cuadro 1). Estas características convierten a los AFLP en uno de los marcadores más idóneos para determinar la diversidad genética entre y dentro de poblaciones de importancia comercial; estimar la tasa de flujo genético entre poblaciones y para la asociación con características cuantitativas (Glaubitz y Moran, 2000; Grattapaglia *et al*, 1997).

Los microsatélites son marcadores codominantes que permiten caracterizar el genotipo de los individuos, al igual que las isoenzimas. Con esta técnica se ha logrado avanzar en teca, donde se ha analizado la colección de clones del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Esta es una de las técnicas más apropiadas para la identificación de clones y verificación de contaminación entre estos materiales. Con la utilización de diez microsatélites se ha podido generar una huella genética para cada uno de los clones (Cuadro 3). Una vez obtenida la identidad de cada clon, se pudo verificar que algunos individuos pertenecían a un mismo clon, a pesar de estar etiquetados como clones diferentes en el jardín clonal, éstos fueron los clones 30 y 34, así como 32 y 38.

Cuadro 3. Genotipo de cada uno de los 25 clones de *Tectona grandis* L.f. del Instituto Tecnológico de Costa Rica, Santa Clara, Alajuela, Costa Rica.

Clon	Genotipos									
	TG-AC01 (Locus A)	TG-AC28 (Locus B)	TC-AC44 (Locus C)	TG-AG04 (Locus D)	TG-AG14 (Locus E)	TG-AG16 (Locus F)	TG-ADH-MS (Locus G)	TG-CPI-MS (Locus H)	TG-AAG10 (Locus I)	TG-ATC02 (Locus J)
2	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	---	D ₂ D ₂	E ₃ E ₅	F ₃ F ₅	G ₂ G ₄	H ₁ H ₂	I ₁ I ₁	J ₁ J ₂
3	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₂ C ₂	D ₄ D ₄	E ₅ E ₅	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₂	I ₂ I ₂	J ₁ J ₄
4	A ₃ A ₃	B ₁ B ₄	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₁ F ₂	G ₂ G ₄	H ₁ H ₂	I ₃ I ₆	J ₆ J ₆
5	A ₂ A ₃	B ₂ B ₆	C ₁ C ₂	D ₄ D ₄	E ₃ E ₅	F ₂ F ₄	G ₄ G ₄	H ₁ H ₁	I ₃ I ₈	J ₁ J ₂
6	A ₃ A ₃	B ₂ B ₅	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₂	F ₃ F ₄	G ₄ G ₄	H ₁ H ₂	I ₄ I ₇	J ₂ J ₄
9	A ₃ A ₃	B ₃ B ₆	C ₁ C ₂	D ₁ D ₁	E ₄ E ₄	F ₁ F ₂	G ₄ G ₄	H ₁ H ₁	I ₄ I ₇	J ₂ J ₅
11	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₂ C ₂	D ₃ D ₃	E ₁ E ₂	F ₁ F ₂	G ₂ G ₄	H ₁ H ₂	I ₅ I ₇	J ₆ J ₆
12	A ₃ A ₃	B ₁ B ₄	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₁	I ₄ I ₄	J ₂ J ₃
14	---	---	---	D ₃ D ₃	---	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₁ H ₁	I ₅ I ₅	J ₁ J ₂
23	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	---	D ₂ D ₂	E ₃ E ₅	F ₂ F ₅	G ₂ G ₂	H ₁ H ₂	I ₄ I ₄	J ₁ J ₁
30	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₂ C ₂	D ₃ D ₃	E ₁ E ₂	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₁	I ₄ I ₄	J ₂ J ₃
34	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₂ C ₂	D ₃ D ₃	E ₁ E ₂	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₁	I ₄ I ₄	J ₂ J ₃
31	A ₃ A ₃	B ₁ B ₄	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₁ F ₂	G ₂ G ₄	H ₁ H ₂	I ₅ I ₇	J ₆ J ₆
32	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₁ C ₂	D ₄ D ₄	E ₅ E ₅	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₂ H ₂	I ₄ I ₇	J ₁ J ₂
38	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₁ C ₂	D ₄ D ₄	E ₅ E ₅	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₂ H ₂	I ₄ I ₇	J ₁ J ₂
33	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₂ C ₂	D ₄ D ₄	E ₅ E ₅	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₂	I ₄ I ₅	J ₁ J ₄
35	A ₃ A ₃	B ₁ B ₄	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₁ F ₂	G ₂ G ₂	H ₁ H ₂	I ₅ I ₇	J ₆ J ₆
41	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₁ H ₁	I ₅ I ₅	J ₁ J ₂
44	A ₁ A ₁	B ₂ B ₅	---	D ₃ D ₃	---	F ₃ F ₄	G ₄ G ₄	H ₁ H ₂	I ₄ I ₇	J ₁ J ₂
45	A ₃ A ₃	B ₂ B ₂	C ₂ C ₂	D ₃ D ₃	E ₅ E ₅	F ₄ F ₄	G ₁ G ₁	H ₁ H ₂	I ₄ I ₄	J ₁ J ₄
50	A ₃ A ₃	B ₂ B ₅	C ₁ C ₂	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₄ F ₄	G ₃ G ₃	H ₁ H ₂	I ₄ I ₄	J ₂ J ₃
53	A ₂ A ₃	B ₂ B ₆	C ₂ C ₂	D ₄ D ₄	E ₃ E ₄	F ₂ F ₄	G ₄ G ₄	H ₁ H ₁	I ₄ I ₉	J ₁ J ₁
60	A ₃ A ₃	B ₁ B ₅	C ₁ C ₂	D ₄ D ₄	E ₂ E ₅	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₂ H ₂	I ₄ I ₇	J ₁ J ₂
68	A ₃ A ₃	B ₂ B ₅	---	D ₃ D ₃	E ₂ E ₅	F ₄ F ₄	G ₂ G ₂	H ₁ H ₂	I ₅ I ₅	J ₂ J ₂
98	A ₃ A ₃	B ₃ B ₆	C ₁ C ₂	D ₁ D ₁	E ₄ E ₅	F ₁ F ₂	G ₄ G ₄	H ₁ H ₁	I ₃ I ₇	J ₂ J ₄

En la Figura 2 se muestra como los clones 30 y 34 son idénticos en su composición genética para cuatro microsatélites, al igual que en los restantes seis microsatélites evaluados.

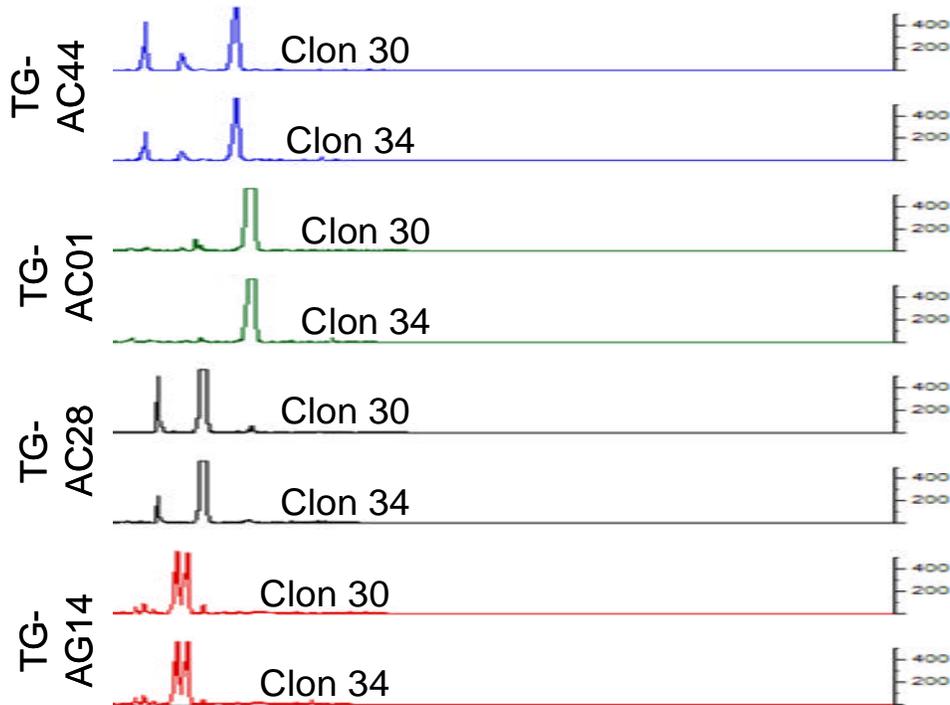


Figura 2. Identidad de los clones 30 y 34 revelada con cuatro microsatélites.

Determinación de la huella genética para cada clon

Como puede observarse en el Cuadro 3, la determinación de una huella genética para cada clon de teca, fue obtenida con base en la utilización de 10 microsatélites. En la Figura 3 se muestra un ejemplo para la elaboración de la huella digital para dos clones de teca. Esto permitiría crear un registro genético para cada clon, el cual podría ser usado como un mecanismo de seguridad cuando se sospecha que el material de estos clones ha sido robado. La técnica de huella digital se usa para la comprobación de la identificación clonal, la contaminación de los jardines clonales por individuos que no pertenecen a la colección y para corregir errores de etiquetado de los rametos dentro del jardín clonal.

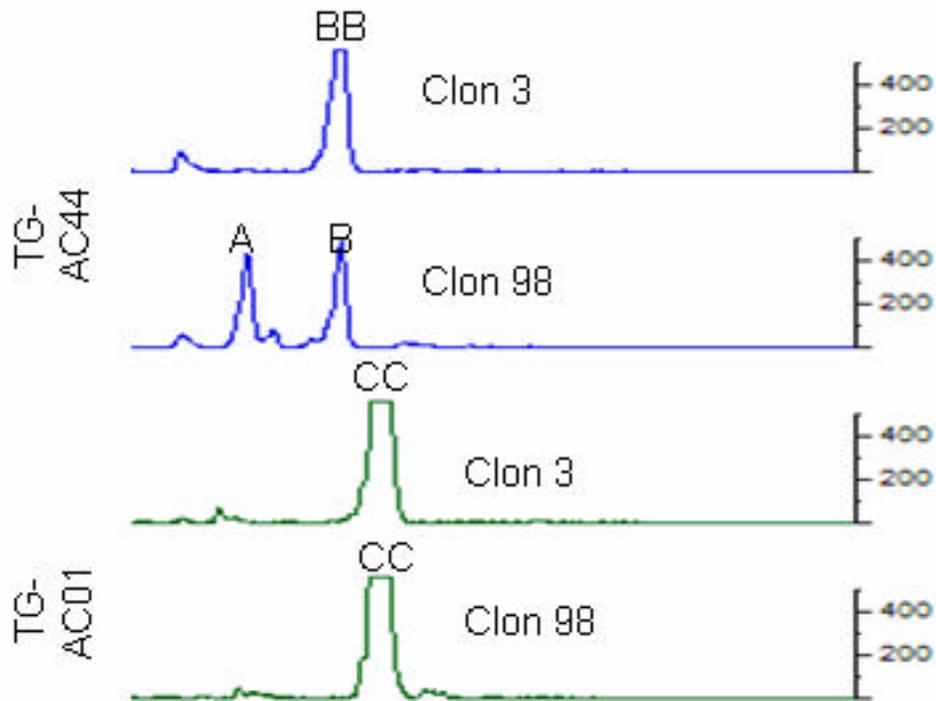


Figura 3. Elaboración de la huella digital para los clones 3 y 98, obtenida a partir de dos microsatélites.

Posibilidades de selección temprana

Con base en muestras de teca de familias contrastantes en los ensayos de progenie del CACH, se investigó posible ADN presente solamente en los individuos superiores en volumen y calidad de fuste (índice de calidad, Rojas y Murillo, 2000).

Se tomaron muestras de las dos mejores familias del ensayo (2 y 20) y de las dos peores (1 y 35) con respecto a su producción volumétrica. También se colectaron muestras de las mejores familias (14 y 27) y de las peores (1 y 19) según su índice de calidad. Se logró determinar que con respecto a la variable calidad, las mejores familias comparten un alto porcentaje de sus elementos genéticos. En un análisis de agrupamiento (Figura 4) se observó que las mejores familias se separan ampliamente de las peores (Araya *et al*, 2004), posibilitando con esta evidencia, continuar profundizando en el ADN que aparece exclusivamente en los mejores materiales del Programa. Se espera continuar trabajando a nivel de secuenciación de estos fragmentos, hasta intentar sentar las bases de un método de selección temprana de material superior.

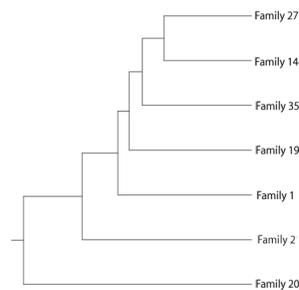


Figura 4. Dendrograma (UPGMA) basado en las distancias genéticas obtenidas a partir de marcadores AFLP. Se muestra el agrupamiento para las mejores y peores familias, tanto para el índice de calidad como para la producción volumétrica (Araya *et al*, 2004).

Determinación de la similitud genética y análisis de parentesco dentro de la población de mejoramiento

Utilizando 10 microsatélites se logró determinar que dentro de la colección de clones de teca de ITCR, algunos de ellos son muy cercanos genéticamente (clones 3 y 33), los cuales comparten un 90% de sus componentes genéticos (Cuadro 4). Los clones 31 y 35 también están estrechamente relacionados, compartiendo un 95% de sus elementos genéticos; también es el caso de los clones 4 y 31 que comparten el 90%. Se determinó el grado de similitud de cada clon con respecto al resto del grupo utilizando la medida de distancia genética de Gregorius (1974).

Cuadro 4. Similitud genética entre los 25 clones de *Tectona grandis* L.f del Instituto Tecnológico de Costa Rica, San Carlos, Alajuela.

Similitud genética																										
	2	3	4	5	6	9	11	12	14	23	30	31	32	33	34	35	38	41	44	45	50	53	60	68	98	
2	**																									
3	0.40	***																								
4	0.40	0.35	***																							
5	0.35	0.40	0.40	***																						
6	0.35	0.35	0.50	0.45	***																					
9	0.25	0.20	0.40	0.50	0.50	***																				
11	0.40	0.40	0.75	0.25	0.55	0.40	***																			
12	0.30	0.50	0.55	0.40	0.55	0.40	0.40	***																		
14	0.20	0.20	0.20	0.25	0.25	0.15	0.25	0.35	***																	
23	0.60	0.35	0.35	0.25	0.30	0.25	0.40	0.35	0.20	***																
30	0.30	0.55	0.40	0.30	0.55	0.35	0.55	0.85	0.35	0.35	***															
31	0.40	0.35	0.90	0.35	0.55	0.45	0.85	0.55	0.25	0.35	0.40	***														
32	0.45	0.65	0.40	0.45	0.50	0.35	0.40	0.50	0.30	0.45	0.45	0.45	***													
33	0.45	0.90	0.35	0.45	0.45	0.25	0.45	0.55	0.25	0.40	0.60	0.40	0.70	***												
34	0.30	0.55	0.40	0.30	0.55	0.35	0.55	0.85	0.35	0.35	1.00	0.40	0.45	0.60	***											
35	0.35	0.35	0.85	0.30	0.50	0.40	0.80	0.55	0.30	0.40	0.40	0.95	0.50	0.40	0.40	***										
38	0.45	0.75	0.40	0.45	0.50	0.35	0.40	0.50	0.30	0.45	0.45	0.45	1.00	0.70	0.45	0.55	***									
41	0.45	0.50	0.60	0.45	0.55	0.35	0.55	0.70	0.60	0.40	0.65	0.60	0.65	0.55	0.55	0.65	0.60	***								
44	0.30	0.25	0.25	0.35	0.55	0.30	0.35	0.30	0.30	0.25	0.35	0.30	0.35	0.30	0.35	0.25	0.30	0.35	***							
45	0.30	0.70	0.40	0.35	0.55	0.25	0.40	0.65	0.30	0.35	0.65	0.40	0.50	0.75	0.65	0.40	0.50	0.50	0.40	***						
50	0.35	0.45	0.50	0.40	0.70	0.35	0.45	0.75	0.30	0.35	0.70	0.50	0.55	0.50	0.70	0.50	0.55	0.65	0.45	0.65	***					
53	0.25	0.40	0.25	0.75	0.40	0.50	0.30	0.30	0.20	0.35	0.35	0.25	0.35	0.45	0.35	0.20	0.35	0.30	0.35	0.40	0.30	***				
60	0.45	0.60	0.45	0.45	0.55	0.35	0.45	0.55	0.30	0.45	0.50	0.50	0.95	0.65	0.50	0.55	0.95	0.70	0.35	0.45	0.60	0.35	***			
68	0.40	0.35	0.45	0.30	0.55	0.20	0.50	0.50	0.50	0.35	0.50	0.50	0.50	0.45	0.50	0.55	0.50	0.75	0.40	0.50	0.65	0.20	0.55	***		
98	0.30	0.30	0.50	0.60	0.50	0.85	0.40	0.40	0.15	0.15	0.30	0.50	0.35	0.30	0.30	0.45	0.35	0.40	0.25	0.30	0.35	0.45	0.35	0.25	**	

En el Cuadro 5 se presenta las distancias genéticas obtenidas. Se encontró que 14 clones tienen una distancia genética mayor al 40% con respecto al resto del grupo (60% de similitud). El alto grado de similitud puede estar explicado por un posible grado de parentesco muy alto (medios hermanos o hermanos completos), ya que fueron árboles plus seleccionados dentro de una misma plantación y edad, con un mismo origen de semilla.

Contrariamente y también revelado por los diez microsatélites utilizados, algunos clones comparten muy poca información genética. Este es el caso de los clones 23 y 98 (15%), también los clones 30 y 98 comparten un bajo porcentaje de sus elementos genéticos (20%). Una de las fases del proyecto comprende el desarrollo de microsatélites a partir de materiales seleccionados en los ensayos de campo del Programa de Mejoramiento Genético Forestal. Esto permitirá ampliar el número de microsatélites utilizados para la verificación de clones, permitiendo obtener un mayor poder de exclusión y certeza con respecto a identidad y similitud de individuos de una población de mejoramiento.

Cuadro 5. Distancia genética de cada clon de teca con respecto al grupo de clones*.

Clon	Distancia genética (D)	Similitud (D-1)
2	0.366	0.634
3	0.432	0.568
4	0.415	0.585
5	0.517	0.483
6	0.386	0.614
9	0.506	0.494
11	0.413	0.587
12	0.401	0.599
14	0.264	0.736
23	0.430	0.570
30	0.429	0.571
31	0.421	0.579
32	0.382	0.618
33	0.369	0.631
34	0.368	0.632
35	0.374	0.626
38	0.423	0.577
41	0.354	0.646
44	0.363	0.637
45	0.445	0.555
50	0.432	0.568
53	0.525	0.475
60	0.339	0.661
68	0.359	0.641

* Tomado (modificado) de (Gregorius, 1974)

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos para cada una de las aplicaciones presentadas, abre la posibilidad de utilizar los marcadores moleculares en la asistencia de programas avanzados de mejoramiento genético. La generación de una huella genética en teca permitirá extender esta aplicación a las colecciones de clones de los miembros de GENFORES y utilizarla como un mecanismo de protección del patrimonio genético. Los resultados de similitud genética y grado de parentesco, sugieren la necesidad y urgencia de ampliar la base genética del Programa de Mejoramiento Genético que desarrolla GENFORES con la especie *Tectona grandis*. 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. Se espera continuar trabajando a nivel de identificación de regiones del ADN presentes solamente en los mejores materiales del Programa de Mejoramiento Genético, hasta intentar sentar las bases de un método de selección temprana de materiales superiores.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación Costa Rica – Estados Unidos de América para la Cooperación (CRUSA), la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y la Vicerrectoría de la Investigación de la Universidad de Costa Rica. Los autores agradecen al Dr. Hugo Volkaert (Center for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University, Thailand) por proporcionar las secuencias de microsatélites de teca. También se agradece al Dr. Paul Keim y al Dr. Scott Woolbright (Northern Arizona University), por el apoyo en el análisis de muestras de teca mediante AFLPs.

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.
- Araya, E; Murillo, O; Rocha, O. 2003. Mejoramiento Genético Forestal asistido por marcadores genéticos. **In** IV Congreso Forestal Nacional, Setiembre, 2003. San José, CR. sp.
- 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. 1-5 Noviembre. Charleston, South Carolina, USA. Disponible en: http://www.ncsu.edu/feop/iufro_genetics2004/proceedings.pdf
- 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.
- Bakker, EG; Van Dam, BC; Van Eck, HJ; Jacobsen, E. 2001. The description of clones of *Quercus robur* L. and *Q. petraea* (Matt.) Liebl. with microsatellites and AFLP in an ancient woodland. *Plant Biology* 3:616-621
- 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 breeder's collection or evergreen azaleas. *Theor. Appl. Genet.* 99:1155-1165.
- Glaubitz, JC; Moran, GF. 2000. Genetic tools: the use of biochemical and molecular markers. **In** Young, A; Boshier, D; Boyle, T (Eds). *Forest Conservation Genetics, Principles and Practice*. Collingwood, AU. CSIRO Publishing. 352 p.
- Grattapaglia, D; Ciampi, A-Y; Gaiotto, F-A; Squilassi, M-G; Collevati, R-G; Ribeiro, V-J; Reis, A-M; Gandara, F-B; Walter, B-M; Brondani, R-P. 1997. DNA technologies for forest tree breeding and conservation. **In** Bruns S, Mantell S, Trägårdh C, Viana A.M (eds), *Recent Advances in Biotechnology for tree conservation and management*, 1997 Sept. BR International Foundation for Science. Florianopolis, 344 p.
- Gregorius, HR. 1974. Genetischer Abstand zwischen Populationen. I. Zur Konzeption der genetischen Abstandsmessung. *Silvae Genetica* 23:22:27.
- Haines, RJ. 1994. La biotecnología en el mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. *Unasylva* 45:46-52.

- Isoda, K; Watanabe, A; Widyatmoko, AYPBC; Rimbawanto, A; Shiraishi, S. 2000. The simple and reliable management of teak (*Tectona grandis*) clones with SCAR (Sequence Characterized Amplified Region) marker. **In** Potentials and Opportunities in Marketing and Trade of Plantation Teak: Challenge for the New Millennium. Jul.-Aug. 2000. Yogyakarta, ID. Faculty of Forestry Gadjah Mada University. 337 p.
- Kertadikara, A-W; Prat, D. 1995. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f.) provenances. *Theor. Appl. Genet.* 90:803-810.
- Kjæer, ED; Siegismund, HR; 1996. Allozyme diversity in two Tanzanian and two Nicaraguan landraces of teak (*Tectona grandis* L.). *Forest Genetics* 3:45-52.
- King, RC; Stansfield, W.D. 1990. A dictionary of genetics. 4a ed. New York, US. Oxford University Press. 406 p.
- Norwati, M; Lee, S.L; Lee, CT; Wickneswari, R. 1999. Evaluation of genetic relatedness among teak clones (*Tectona grandis* L.) using Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). **In** Fifth Conference on Forestry and Forest Products Research (CFFPR) 1999 Series. Oct. Forest Research Institute, MY.
- Rojas, O; Murillo, O. 2000. Calidad de las plantaciones de teca en la Península de Nicoya, Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 24(2):65-76.
- Valadez, E; Kahl, G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas: teoría y protocolos de laboratorio. Distrito Federal, MX. Mundi-Prensa. 147 p.
- Watanabe, A; Widyatmoko, A; Rimbawanto, A; Shiraishi, S. 2004. Discrimination of teak (*Tectona grandis*) plus trees using selected random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *Journal of Tropical Forest Science* 16:17-24.