

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Gmelina arborea*
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP (Amplified
Fragment Length Polymorphism)**

GINA PAOLA SOLANO FLOREZ

TRABAJO DE GRADO

Presentado como requisito parcial

Para optar al título de

Magister en Ciencias Biológicas

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA

FACULTAD DE CIENCIAS

Bogotá, D. C. 2010

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Gmelina arborea*
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP (Amplified
Fragment Length Polymorphism)**

GINA PAOLA SOLANO FLOREZ

Directora

María del Pilar Márquez M.Sc.

**Pontificia Universidad Javeriana
Facultad de Ciencias Básicas**

2010

NOTA DE ADVERTENCIA

Artículo 23 de la Resolución N° 13 de Julio de 1946

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Solo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y por que las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vea en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”.

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Gmelina arborea*
MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP (Amplified
Fragment Length Polymorphism)**

GINA PAOLA SOLANO FLOREZ

APROBADO

María del Pilar Márquez M.Sc
Directora

José Salvador Montaña M.Sc

Miguel Rodríguez

Víctor Manuel Nieto M.Bs

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CLONES DE *Gmelina arborea*
**MEDIANTE EL USO DE MARCADORES MOLECULARES AFLP (Amplified Fragment
Length Polymorphism)**

GINA PAOLA SOLANO FLOREZ

APROBADO

Ingrid Schuler Ph.D
Decana Académica
Facultad de Ciencias

Manuel Franco Ph.D
Director de Postgrado
Facultad de Ciencias

Agradecimientos

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Pizano S.A y a la Pontificia Universidad Javeriana por la financiación de este trabajo.

A María del Pilar Márquez, por su constante e incondicional apoyo, asesoría.

A mis papas y hermana por ayudarme siempre y brindarme un apoyo incondicional en el cumplimiento de mis logros.

A mis amigos Natalia Fonseca y Jairo Moreno por apoyarme en el desarrollo de este trabajo, en general a todas las personas de la Unidad de Biotecnología Vegetal que prestaron su ayuda siempre que fue necesaria.

A ti porque tu amor y tu fuerza me dieron las alas para volar, porque aun en la distancia estas a mi lado.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|--|-----------|
| INDICE DE FIGURAS..... | xi |
| 1. INTRODUCCIÓN..... | 2 |
| 2. MARCO TEORICO | 3 |
| 2.1. <i>Gmelina arborea</i> L..... | 3 |
| 2.1.1. Taxonomía..... | 3 |
| 2.1.2. Nombres comunes | 3 |
| 2.1.3. Variedades | 4 |
| 2.1.4. Origen y distribución | 4 |
| 2.1.5. Descripción Botánica de <i>Gmelina arborea</i> | 5 |
| 2.1.6. Características de la especie | 6 |
| 2.1.7 Propagación | 6 |
| 2.1.8 Importancia Económica | 7 |
| 2.2. Silvicultura clonal | 8 |
| 2.2.1. Ventajas de la silvicultura clonal | 9 |
| 2.3. Mejoramiento genético forestal | 10 |
| 2.4. Marcadores Moleculares | 11 |
| 2.4.1. Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)..... | 13 |
| 2.4.2. Ventajas del Método | 15 |
| 2.4.3 Marcadores moleculares en identificación clonal | 15 |
| 2.5. Certificación clonal | 18 |
| 2.6. Variación intraclonal | 20 |
| 2.7. Biotecnología en <i>Gmelina arborea</i> | 21 |
| 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN | 23 |
| 4. OBJETIVOS | 25 |

| | |
|---|-----------|
| 4.1. Objetivo general..... | 25 |
| 4.2. Objetivos específicos..... | 25 |
| 5. MATERIALES Y METODOS | 26 |
| 5.1. Población de estudio..... | 26 |
| 5.2. Material vegetal | 27 |
| 5.3. Estandarización del protocolo de extracción de DNA..... | 27 |
| 5.4. Amplificación con marcadores moleculares AFLP..... | 27 |
| 5.4.1. Digestión del DNA | 28 |
| 5.4.2. Ligación del DNA | 28 |
| 5.4.3. Preamplificación (PCR+1) | 28 |
| 5.4.4. Amplificación selectiva (PCR+2) | 29 |
| 5.5. Variación intra clonal | 30 |
| 5.6. Perfiles genéticos o huella genética..... | 30 |
| 5.7. Análisis de información | 31 |
| 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN | 31 |
| 6.1. Extracción de DNA..... | 31 |
| 6.2. Variación intraclonal | 33 |
| 6.2.1. Efecto clonal..... | 35 |
| 6.3. Análisis con marcadores AFLP | 36 |
| 6.3.1. Análisis de diversidad genética | 37 |
| 6.3.2. Análisis de coordenadas Principales Camcore – Pizano S.A..... | 39 |
| 6.4. Análisis con marcadores AFLP Colección Pizano S.A..... | 41 |
| 6.4.1. Análisis de diversidad genética de la colección de Pizano S.A..... | 41 |
| 6.4.2. Análisis de coordenadas principales colección Pizano S.A..... | 44 |
| 6.5. Análisis con marcadores AFLP Colección Camcore | 45 |

| | |
|---|-----------|
| 6.5.1. Análisis de diversidad genética de la colección de Camcore | 46 |
| 6.5.2. Análisis de coordenadas colección Camcore | 49 |
| 6.6. Perfiles genéticos o huella genética | 53 |
| 7. CONCLUSIONES | 55 |
| 8. RECOMENDACIONES | 56 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 57 |
| 10. ANEXOS | 67 |

INDICE DE TABLAS

| | |
|--|----|
| Tabla 1. Combinaciones de “primers” <i>Eco</i> -RI x <i>Mse</i> I para el análisis de clones de <i>Gmelina arborea</i> mediante AFLP | 29 |
| Tabla 4. Resultados análisis de varianza ANOVA para variación intra clonal de clones de <i>Gmelina arborea</i> | 34 |
| Tabla 3. Número total de bandas, número de bandas monomórficas, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con marcadores AFLP. | 36 |
| Tabla 4. Porcentaje de polimorfismo obtenido en 68 clones <i>Gmelina arborea</i> con marcadores AFLP..... | 37 |
| Tabla 5. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de 68 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Pisano S.A. y Camcore | 39 |
| Tabla 6. Combinación de “primers” utilizados para el análisis de DNA de <i>Gmelina arborea</i> colección Pisano S.A con marcadores AFLP. | 41 |
| Tabla 7. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de <i>Gmelina arborea</i> de 33 clones de la colección Pisano S.A. | 44 |
| Tabla 8. Combinación de “primers” utilizados para el análisis de DNA de <i>Gmelina arborea</i> de la colección de Camcore con marcadores AFLP..... | 46 |
| Tabla 9. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de <i>Gmelina arborea</i> (35 clones) colección Camcore | 49 |

INDICE DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Mapa de distribución geográfica de 35 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Camcore..... | 26 |
| Figura 2. Dendrogramas usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genéticas presentes entre los individuos del clon 37 y los individuos del clon 48 de <i>Gmelina arborea</i> mediante marcadores AFLP. | 34 |
| Figura 3. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genéticas presentes entre los 68 clones de <i>Gmelina arborea</i> mediante marcadores AFLP de la colección Pizano S.A. y Camcore | 38 |
| Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCA) 68 clones <i>Gmelina arborea</i> colección Pizano S.A (Piz) y Camcore (Cam) | 40 |
| Figura 5. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genética mediante marcadores AFLP de 33 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Pizano S.A. | 43 |
| Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCA) 33 clones <i>Gmelina arborea</i> colección Pizano S.A..... | 45 |
| Figura 7. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genética mediante marcadores AFLP de 35 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Camcore..... | 47 |
| Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCA) de 35 clones <i>Gmelina arborea</i> colección Camcore..... | 50 |

ANEXOS

| | |
|---|-----------|
| Anexo 2. Protocolos de extracción evaluados | 68 |
| Anexo A. Protocolo de extracción de DNA (Doyle & Doyle 1990 modificado) | 68 |
| Anexo B. Protocolo de extracción Kit Quiagen | 68 |
| Anexo C. Protocolo de extracción Stefenon <i>et al.</i> 2004..... | 68 |
| Anexo 3. Protocolo de tinción de plata | 70 |
| Anexo 4. Pureza y cantidad de DNA de 33 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Pizano S.A. Protocolo Stefenon <i>et al</i> (2004). | 71 |
| Anexo 5. Pureza y cantidad de DNA de 35 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Camcore Protocolo Stefenon <i>et al</i> (2004) | 73 |
| Anexo 6. Perfiles genéticos de 33 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Pizano S.A | 75 |
| Anexo 7. Perfiles genéticos de 35 clones de <i>Gmelina arborea</i> colección Camcore81 | |

RESUMEN

Gmelina arborea es una especie nativa de la India, perteneciente a la familia de las Verbenaceae, con gran valor económico en el sector forestal Colombiano, debido a las características de fácil adaptación, rápido crecimiento y los diferentes usos que se le dan a la madera.

Una primera etapa para el desarrollo de programas de mejoramiento asistido por marcadores moleculares, requiere del conocimiento de la diversidad genética de la especie. Las técnicas de biología molecular y en particular los marcadores moleculares permiten conocer, caracterizar y estimar la diversidad genética y las relaciones entre los grupos de interés. La existencia de variabilidad entre las especies y poblaciones de la misma especie, conlleva a un beneficio a la hora de implementar programas de mejoramiento y selección de especies con interés agrícola y ecológico.

En este estudio se evaluaron 68 individuos de *Gmelina arborea* pertenecientes al programa de mejoramiento genético de la empresa Pizano S.A. Estos individuos pertenecen a dos colecciones: Pizano S.A y Camcore. El DNA fue aislado utilizando el protocolo de Stefenon *et al* (2004). El nivel de diversidad genética fue estimado utilizando marcadores moleculares AFLP aplicando el índice de similitud de DICE y agrupando las muestras utilizando el algoritmo UPGMA.

Los resultados obtenidos en el análisis de similitud mostraron una amplia diversidad entre las dos colecciones y baja al interior de cada una de ellas, permitiendo sugerir los posibles cruces en la siguiente fase del plan de mejoramiento de la especie. De igual manera se lograron establecer *fingerprintings* de cada uno de los clones evaluados, siendo este el primer paso en el proceso de certificación molecular de material forestal de propagación.

1. INTRODUCCIÓN

El conocimiento de la distribución de la variabilidad genética es importante para el desarrollo de estrategias de conservación efectivas en especies de interés comercial y ambiental. Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares permiten conocer, caracterizar y estimar la diversidad genética existente entre y dentro de las poblaciones.

Gmelina arborea es una especie con gran potencial por su valor económico en el sector forestal Colombiano, debido a las características de fácil adaptación, rápido crecimiento y los diferentes usos que se le dan a la madera. En Colombia dentro de su programa de mejoramiento genético la empresa PIZANO S.A ha seleccionado 33 clones teniendo en cuenta características agromorfológicas como la calidad de la madera y la capacidad de enraizamiento; así mismo busca identificar los clones que se adapten mejor a diferentes zonas del norte del país.

No obstante y en razón a la extensión en tiempo, décadas que conlleva el programa de mejoramiento genético, existen dudas sobre la identidad y diversidad genética de estos materiales por lo que se hace necesario el desarrollo de una herramienta que permita la identificación de cada uno de los clones a tiempo que es factible evaluar la base genética de los clones pertenecientes al programa de mejoramiento genético, de manera rápida y confiable.

Este estudio planteó adaptar un protocolo para la obtención de marcadores AFLP en *G. arborea* desarrollado en Costa Rica (Araya *et al* 2005). Esta herramienta permitió identificar y certificar genéticamente los diferentes clones de *G. arborea* y estimar la variabilidad genética presente en el material vegetal con el que cuenta la empresa Pizano S.A.

2. MARCO TEORICO

2.1. Gmelina arborea L.

El género *Gmelina* fue descrito por Linneo en 1742 y la especie *G. arborea*, Roxburg 1814. *Gmelina arborea* Roxb pertenece a la familia Verbenaceae, es una especie forestal de rápido crecimiento y una de las pocas que en nuestro país ofrece amplias posibilidades para el desarrollo de reforestaciones industriales, debido entre otros aspectos a su rápido crecimiento, su relativa facilidad de manejo y la versatilidad de usos de la madera.

2.1.1. Taxonomía

Reino: Vegetal

División: Angiospermophyta

Clase: Magnoliopsidae

Subclase: Asteridae

Orden: Labiales

Familia: Verbenaceae

Género: *Gmelina* L.

Especie: *Gmelina arborea* (Roxb) 1814

2.1.2. Nombres comunes

En América tropical se le conoce como melina, en Indonesia se le conoce como yemane y en la India gamari o gumadi. Otros nombres son gemelina, gmelina, gumhar, kashmir tree, malay beechwood, snapdragon, teca blanca, yemani (Birmania), so, so-maeo (Tailandia), kumhar, sewan (Pakistán), shivani (Indias central), gamar (Bangladesh) (Mariño 2006).

2.1.3. Variedades

Han sido reportadas tres variedades de la especie: *Gmelina arborea* var. *arborea*, *Gmelina arborea* var. *glaucescens* y *Gmelina arborea* var. *canencens*, y su mayor diferencia está dada por su distribución natural (Rodríguez *et al.* 2004).

2.1.4. Origen y distribución

Gmelina arborea se encuentra naturalmente en latitudes Norte 5° a 30° y longitudes de Este 70° a 110° E, esta especie es nativa de India, Bangladesh, Sri Lanka, Myanmar, Tailandia, sur de China, Laos, Camboya y Sumatra en Indonesia y es una importante fuente maderera en las regiones tropicales y subtropicales de Asia.

Se estiman aproximadamente 700 000 hectáreas de plantaciones de *G arborea* en los trópicos y subtropicos. La India (Sudeste de Asia y Región Pacífica) presenta el área plantada más extensa con 371 000 ha (53%), seguidas de África con 252 000 (36%) y Latinoamérica con 71 000 (11%) respectivamente (Dvorak 2004). En contraste con estos datos, Lauridsen & Kjaer (2002) aseguran que en Latinoamérica existían 130 000 ha, sembradas de esta especie para 1990, de las cuales en Costa Rica se hababan aproximadamente 65 000 (Moya 2004).

En Colombia el establecimiento de las plantaciones de *G. arborea* se inicio alrededor de 1980, principalmente en la Región de Caribe, específicamente en los municipios de Santa Ana y Monterrubio (Magdalena), así como en Zambrano y Córdoba (Bolívar).

En Colombia existen cerca de 11.200 hectáreas industriales y de uso común de *Gmelina arborea*, concentradas principalmente en los departamentos de Bolívar, Magdalena, Llanos Orientales, Tolima y Cundinamarca. La compañía Pizano S.A. a través de su filial Monterey forestal Ltda posee más de siete mil hectáreas de Melina que corresponden a un 49.7% del total de sus plantaciones en la región de la costa Atlántica de Colombia (Cadena & Guauque 2009)

2.1.5. Descripción Botánica de *Gmelina arborea*

Melina se caracteriza por ser una planta de rápido crecimiento, oportunista en los bosques húmedos y se clasifica como una pionera de vida larga. Su capacidad de rebrote es excelente pues presenta un crecimiento rápido y vigoroso. Es una especie caducifolia, en las zonas secas, puede llegar a medir 30 m de altura y presentar más de 80 cm de diámetro. Tiene un fuste marcadamente cónico, por lo regular de 50-80 cm de diámetro, en ocasiones hasta de 143 cm, sin contrafuertes pero en ocasiones engrosado en la base (Motta 1996, Espinosa 2003, Rodríguez *et al.* 2004).

Presenta una copa amplia en sitios abiertos, pero en plantación su copa es densa y compacta, la corteza es lisa o escamosa, de color marrón pálida a grisácea; en árboles de 6-8 años de edad se exfolia en la parte engrosada de la base del tronco y aparece una nueva corteza, de color más pálido y lisa. Su sistema radical es profundo, aunque puede ser superficial en suelos con capas endurecidas u otros limitantes de profundidad.

Las hojas se caracterizan por ser grandes (10-20 cm de largo), simples, opuestas, enteras, dentadas, usualmente más o menos acorazonadas, de 10-25 cm de largo y 5-18 cm de ancho, decoloradas, el haz verde y glabro, el envés verde pálido y aterciopelado, nerviación reticulada, con nervios secundarios entre 3 y 6 pares y estípulas ausentes (Greaves 1981, Motta 1996). Usualmente en las áreas, la especie bota las hojas durante los meses de enero o febrero en casi todas las regiones donde se cultiva. Las hojas nuevas se producen el marzo o a principios de abril (Rodríguez *et al.* 2004).

Las flores son de color amarillo-anaranjadas, en racimos, monoicas perfectas, cuya inflorescencia es un racimo o panícula cimosa terminal, cáliz tubular, corola con 4-5 sépalos soldados a la base del ovario, de color amarillo brillante, cáliz 2.5 cm de largo y 4 estambres. La floración ocurre justo cuando las hojas han caído. En su área de distribución natural la melina florece los meses de febrero a abril (Kijkar 2003).

El fruto es carnoso tipo drupa, de forma ovoide u oblonga, succulento, con pericarpo coriáceo y endocarpo óseo, de color verde lustroso, tornándose amarillo brillante al

madurar, momento en el que caen al suelo, lo que facilita su recolección. Las semillas de la especie se encuentran formando parte del endocarpo del fruto, son de forma elipsoidal, comprimidas, de 7-9 mm de largo; testa color café, lisa, opaca, membranosa, muy delgada; el embrión es recto, comprimido, de color amarillo-crema y ocupa toda la cavidad de la semilla; dicotiledónea, los cotiledones se caracterizan por ser grandes, planos, carnosos y elipsoidales; la radícula es inferior y corta.

2.1.6. Características de la especie

La temperatura óptima para el buen desarrollo fisiológico de *G. arborea* es a un máximo de 38–48°C y mínimo de 1-16°C. Su distribución en América se observa en zonas como Centro y Suramérica en sitios con temperaturas entre los 24 a 29 °C.

Los niveles de precipitación promedio anual óptimos para la especie, varían de 750 a 2000 mm; puede desarrollarse en zonas que presenten una precipitación de 4500 mm, los mejores rendimientos de la especie se presentan a altitudes que van de 0 a 1500 m.s.n.m. Requiere un periodo seco de dos a ocho meses (Motta 1996).

Dentro de las características edáficas para establecer plantaciones de *G. arborea* con buena calidad, se encuentran un buen drenaje y disponibilidad de nutrientes (Vásquez & Ugalde 1996). Los suelos por lo general deben ser profundos y presentar una textura entre franca y franco arcillosa, también deben ser húmedos y bien aireados, alcalinos o ligeramente ácidos con un pH ente cinco y ocho (Motta 1996, Espinoza 2003).

2.1.7 Propagación

Esta especie se reproduce de manera sexual (semilla), así como asexualmente o vegetativamente por medio de estacas

La propagación por semilla se inicia con la recolección de los frutos maduros, estos se despulpan y los endocarpos secos son llevados a una humedad entre 9-11% para su almacenamiento. Las semillas son sembradas de forma directa con una distancia entre estas de 15 x 20 centímetros con una densidad de mil unidades por metro cuadrado cubriendo la semilla ligeramente con tierra o cascarilla de arroz. Bajo condiciones

favorables de riego las semillas de *G arborea* empiezan a germinar entre los siete a quince días después de la siembra (Motta 1996).

Por otra parte la reproducción asexual o vegetativa se realiza a partir de algunas partes de la planta, *G arborea* es propagada vegetativamente a partir de partes de tallo, estacas, injertos y formación de raíces adventicias entre otros (Romero 2004).

2.1.8 Importancia Económica

El interés en el sector forestal por melina se debe a la relativa homogeneidad y la estabilidad de la madera, que la hacen adecuada para la obtención de celulosa, que a su vez es utilizada en la fabricación de diferentes tipos de papel de alta calidad (Dvorak 2004), esta especie presenta un alto contenido de celulosa (40 – 47%). La madera es utilizada en carpintería por la facilidad para trabajarla (Motta 1996, Moya 2004, Romero 2004). Así mismo se han establecido monocultivos de melina para la producción de pulpa de papel, como fue el caso de Brasil con el desarrollo del “proyecto Jari” con 160 000 hectáreas cultivadas en la amazonia brasileña con este fin (Carrere 2006).

Por su característica de rápido crecimiento y pronto retorno de inversión, es una especie de uso múltiple, que presenta gran potencial agroforestal; puede emplearse como cerca viva, cortina rompevientos y linderos maderables (Rodríguez *et al.* 2004). Así mismo se ha considerado en los programas agroforestales, enfocándose en el mejoramiento genético de la especie; teniendo como resultado mayor rendimiento en el crecimiento, madera más uniformes, tolerancia a enfermedades y a estrés hídrico (Mariño 2006).

A nivel mundial países como India y Costa Rica han sido pioneros en el establecimiento de jardines clonales y el mejoramiento genético de la especie con excelentes resultados en las características comerciales de la misma como lo son la altura y el DAP (Diámetro a la Altura del Pecho) (Kumar *et al.* 2003), convirtiéndose estos países en los principales proveedores de semilla (Barrantes 1999).

Gmelina arborea ocupa el sexto puesto de las especies identificadas con alto potencial de incremento de rendimiento haciendo uso de la biotecnología y el mejoramiento genético; en Colombia esta es una de las especies forestales que tiene mayor uso y demanda de

sus diferentes productos con calidad de huerto semillero o de genética superior, dejando en evidencia un comportamiento positivo en planes de establecimiento de plantaciones forestales; en la actualidad el país cuenta con 11.200 hectáreas (Córdoba 2009).

De acuerdo con los reportes de la FAO y cálculos de proexport, el consumo de agregado de madera y astilla aumento un 7% en el periodo comprendido entre el 2006 y el 2007; en el mismo periodo el consumo de pulpa de papel aumento un 3% (Córdoba 2009).

Por otra parte las hojas, flores, raíces y corteza son usadas en la medicina tradicional, por ejemplo, las drupas se emplean como ingrediente de cocciones refrigerantes para fiebres y afecciones biliares. Una pasta hecha con las hojas es aplicada en la cabeza para calmar las fiebres (Greaves 1981).

2.2. Silvicultura clonal

El desarrollo forestal de un país se basa en la silvicultura, en la actualidad la propagación clonal o silvicultura clonal de especies forestales se ha constituido en un tema de creciente interés, dado el indiscutible potencial que tiene como herramienta en el campo del mejoramiento genético y en el desarrollo de plantaciones clonales operacionales de alto rendimiento, homogeneidad y calidad (López 2004, Leakey *et al.* 1990).

Las plantaciones clonales de especies forestales se consideran parte de la silvicultura de vanguardia, la cual implican la combinación de tecnologías de propagación vegetativa con programas de mejoramiento genético y adecuados manejos silviculturales; permitiendo de esta manera alcanzar mejores rendimientos de los árboles en cada uno de los sitios seleccionados para la siembra.

La reproducción asexual es la obtención de un nuevo individuo a partir de partes vegetativas de la planta original, sin que exista un proceso de fecundación, generando copias genéticamente idénticas a la planta madre original. El conjunto de descendientes de una planta, obtenidos mediante la aplicación de una técnica de propagación vegetativa, es un **clon**. Cada uno de los integrantes de ese clon se denominan **rametos**, los cuales son genéticamente idénticos entre sí e idénticos a la planta madre que los originó (López 2004).

De esta manera la clonación permite el aprovechamiento de un genotipo único (seleccionado entre muchas otras plantas por su superioridad en algún aspecto de interés comercial) y la obtención de nuevos individuos con el mismo genotipo. Los miembros de ese clon exhibirán una tendencia a la uniformidad fenotípica y presentarán en general el mismo aspecto (tamaño, velocidad de crecimiento, etc.) (López 2004, Carpineti, 2005).

La estrategia de silvicultura/agroforestería clonal se define como la utilización de genotipos sobresalientes o superiores de forma masiva (Gutiérrez 1994) el material utilizado es aquel que ha sido seleccionado por sus buenas características fenotípicas y que proviene de las mejores procedencias (Leakey & Mésen 1994)

2.2.1. Ventajas de la silvicultura clonal

La silvicultura clonal permite obtener ganancias genéticas grandes en cuanto a la productividad y calidad, mayor rentabilidad y la consecuente reducción en los ciclos de la rotación de las especies forestales (Leakey & Mesén 1994, Carpineti, 2005).

El potencial de la ganancia genética mediante técnicas clonales, se origina en la capacidad de capturar tanto los componentes genético aditivos como los no aditivos; diferente a lo que sucede cuando se usa la semilla, debido a que en la reproducción sexual se debe tener en cuenta la recombinación y segregación genética, dando como posible resultado la pérdida de combinaciones alélicas específicas que determinan la expresión de superioridad. Mediante la selección de árboles superiores o *plus*, generalmente es posible lograr un mejoramiento en la productividad y calidad más rápidamente (Leakey & Mesén 1994, López 2004, Carpineti, 2005).

Desde el punto de vista operacional las plantaciones monoclonales presentan gran homogeneidad en crecimiento, forma y calidad de la madera. Esa reducción de la variación individual tiene fuertes connotaciones positivas en cuanto a la densidad inicial de plantación, los costos de aprovechamiento, transporte y fundamentalmente en la producción de materia prima con una calidad altamente predecible (López 2004)

De igual manera permite utilizar la especificidad de un clon para potenciar la expresión en sitios específicos o bien utilizar clones de amplia adaptación a diversos sitios (Carpineti, 2005)

Teniendo en cuenta lo anteriormente planteado, cabe mencionar que las estrategias de silvicultura clonal dependen directamente de los recursos genéticos existentes, por eso se hace necesario la producción permanente de nuevos clones, que den sustento a este tipo de producción. Por lo que se plantea la necesidad de mantener simultáneamente a un programa operacional clonal un programa de mejoramiento genético, así como la correcta utilización operacional de los clones en el tiempo (Carpineti, 2005)

2.3. Mejoramiento genético forestal

El proceso de mejoramiento genético forestal implica el desarrollo de poblaciones genéticamente superiores en una o varias características (crecimiento, forma, calidad de madera, etc.) Un programa de mejoramiento genético generalmente inicia con la selección de individuos que presentan características fenotípicas estables en una población determinada. Los árboles seleccionados son evaluados posteriormente para determinar su calidad genética e incorporarlos a un programa de cruzamiento selectivo, para de esta manera generar nuevas combinaciones genéticas en las siguientes generaciones (Ipinza 1998).

Este proceso debe ser dinámico, en respuesta a factores bióticos (aparición de nuevas plagas y enfermedades, etc.) y abióticos (factores climáticos cambiantes), o por las demandas por desarrollo de nuevos productos, etc., en constante evolución. Por lo tanto el reto de las estrategias de mejoramiento forestal es formular planes a largo plazo que consideren varias generaciones y que a su vez sean suficientemente flexibles para incorporar innovaciones en la genética y en los métodos de propagación clonal.

La finalidad del mejoramiento genético forestal es el establecimiento de plantaciones más estables, aumentando de esta manera la producción y mejorando aquellos factores que condicionan la calidad; el concepto mejoramiento implica que en cada generación aumente la proporción de árboles que poseen las mejores características y están mejor adaptados a cada ambiente ecológico, en particular menos susceptibles a la eventual

aparición de plagas y/o enfermedades y a variaciones en la marcha del tiempo (ciclos de alta y baja precipitaciones, periodos de frío intenso, etc.).

El éxito de los programas de mejoramiento genético, se determina por la calidad de los árboles seleccionados, la ganancia genética y la correcta captura, utilización y distribución operacional de los recursos genéticos disponibles. Las expectativas de esta ganancia dependen tanto del control genético de las características de interés como de la variabilidad existente en la población (Balcorta 2004).

El potencial del mejoramiento o las posibilidades de hacer selección depende fundamentalmente de la variabilidad genética de la especie. La variabilidad genética se define como las diferencias genotípicas entre individuos de una población. En general entre mayor sea la variación de la constitución genética entre individuos, mayores posibilidades tienen las especies o poblaciones para sobrevivir o adaptarse a los cambios en las condiciones ambientales. Para el mejoramiento forestal esta condición también significa un mayor potencial para seleccionar y desarrollar una composición genética definida, por lo que es fundamental asegurar una base genética amplia y diversa (Martin *et al* 2001).

La variación puede ser continua o clinal (sigue un gradiente ambiental) o discontinua ecotípica (grupo de individuos con genotipos similares que ocupan un nicho ecológico específico) que es la respuesta genotípica de una especie a un hábitat específico, es por esto que la determinación de la magnitud de la variación entre y dentro de orígenes es clave para delinear la mejor estrategia de mejoramiento (Martin *et al*. 2001)

2.4. Marcadores Moleculares

La selección de individuos para programas de mejoramiento forestal por mucho tiempo se ha realizado basándose en características fenotípicas tales como calidad de la madera y tasa de crecimiento entre otros (Araya *et al*. 2005), sin embargo estas características se ven afectadas por el medio ambiente en el cual se desarrollan. El desarrollo de las técnicas moleculares como los marcadores moleculares permite el conocimiento de las diferencias entre individuos a nivel del genoma (Rocha 2003).

Los marcadores moleculares son definidos como secuencias de DNA, Rocha (2003) plantea que estos fragmentos de DNA pueden ser físicamente localizados dentro del genoma de un organismo. En ocasiones estos fragmentos pueden encontrarse cerca de un gen que codifica una característica de interés, aunque también pueden estar en una región no codificante. Una de las características fundamentales de estos marcadores es que son específicos para cada individuo, especie o grupos sistemáticos mayores.

Los marcadores moleculares se han convertido en una herramienta útil para la detección de la diversidad genética, con su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas asistida por marcadores (Rocha 2003). En biotecnología forestal estos son utilizados para la identificación genética de árboles, proporcionando el perfil genético de cada organismo, y la localización de genes que determinen características cuantitativas (Carson *et al.* 1996, Haines 1994).

Dentro de las ventajas de los marcadores moleculares encontramos la estabilidad, permitiendo que sean detectados en todos los tejidos, independiente de la etapa de desarrollo de la planta; carecen de efectos pleiotrópicos y epistáticos, ya que no se ven afectados por el medio ambiente lo cual los convierte en una herramienta útil para el análisis tanto de poblaciones como de individuos (Stuber *et al.* 1999, Caetano-Anolles & Trigiano 1997, Karp *et al.* 1997).

Actualmente los marcadores moleculares se emplean, para hacer más eficiente la selección de plantas y de variedades, utilizadas en programas de mejoramiento genético forestal (metodología que se conoce como selección asistida por marcadores). Este tipo de selección hace posible la predicción de los genotipos a obtener en un determinado cruce, con base en la información de los parentales empleados, de igual manera tiene aplicaciones en el control de calidad, pues permite 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, así como la comprobación de la identidad clonal o la contaminación de los jardines y huertos clonales.

Dentro de los marcadores moleculares que permiten establecer las diferencias existentes entre los individuos comparando su DNA, se destacan los RFLP (Restriction Fragment

Length Polymorphism), RAPD (Random Amplification of Polymorphic), SSR (Short Sequence Repeat), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) entre otros, los cuales abren las posibilidades de generar huellas genómicas (*fingerprintings*), de las especies de interés, útiles para la identificación genética y certificación de clones (Bustamante *et al.* 2001, Dahlberg *et al.* 2002, Karp *et al.* 1997, Thompson *et al.* 1998).

La elección de un marcador molecular depende del objetivo que se busca, de la estructura de la población, de la diversidad genómica de la especie que se va analizar, de la disponibilidad del sistema y del tiempo requerido para el análisis. Debido a que cada uno de los marcadores presenta ventajas y desventajas, antes de escoger algún sistema, es vital evaluar el potencial de utilidad que puede tener en una población, especie o género, de igual forma se debe evaluar la eficiencia de la técnica en la detección de polimorfismos (Staub *et al.* 1997).

Las técnicas moleculares ofrecen una herramienta para acelerar los procesos de selección de clones en los programas de mejoramiento genético forestal y de esta manera potencializar las ganancias genéticas (Carson *et al.* 1996; Dale y Chaparro, 1996), pues el conocimiento de la variación genética presente en una colección o población determinada, es la base de los programas de manejo forestal.

2.4.1. Marcadores AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

La tecnología del polimorfismo en la longitud del fragmento amplificado (AFLP) es una técnica que hace uso de la huella genómica del DNA. Esta huella es usada para visualizar los polimorfismos del DNA entre las diferentes muestras que se analizan. De igual manera estas pueden ser usadas para evaluar la relación existente entre estas muestras. Por otra parte se utilizan como fuente de marcadores moleculares para generar mapas de ligamento (Mueller *et al.* 1999).

La técnica de AFLP, se basa en la detección de fragmentos de restricción por amplificación de PCR (Segura 2002; Vos 1995). Los AFLP son una herramienta útil para determinar la identidad de una muestra específica de DNA, para asegurar la relación entre muestras o para identificar marcadores moleculares asociados a rasgos fenotípicos y/o loci genéticos (Invitrogen 2003)

Los marcadores AFLP se caracterizan por combinar dos técnicas, una de ellas los RAPD, basados en la amplificación de fragmentos de DNA, utilizando “primers” arbitrarios y los RFLP basados en la hibridación con sondas específicas, y el corte o digestión con enzimas de restricción. Por esta razón los AFLP presentan varias ventajas, entre las que se encuentran, el no requerir información previa de la secuencia a analizar y la sensibilidad que permite la detección de fragmentos de baja abundancia (Echenique *et al* 2004).

Se plantea que esta técnica se divide en cuatro pasos fundamentales: digestión, ligación, pre-amplificación y amplificación, estos dos últimos son tomados como uno solo por algunos autores.

Digestión: Esta se lleva a cabo de acuerdo a Vos *et al* (1995), por medio de dos enzimas específicas de restricción, de las cuales una de ellas es de corte raro, *EcoRI*, que reconoce seis pares de bases; y la otra de corte frecuente, *Msel*, que reconoce cuatro pares de bases (Vos *et al* 1995, Blears *et al* 1998).

Ligación: Los fragmentos generados en la digestión, son ligados, mediante una ligasa, a adaptadores específicos para cada enzima de restricción con el fin de generar secuencias conocidas para la amplificación.

Generalmente estos adaptadores son “primers” de doble cadena, complementarios a la secuencia de corte de las enzimas; estos están diseñados de tal manera que la ligación de un fragmento a un adaptador no reconstituye los sitios de restricción (Blears *et al.* 1998).

Las secuencias terminales en cada fragmento adaptado están conformadas por la secuencia del adaptador y el remanente de la secuencia del sitio de restricción, las cuales sirven para la unión de los “primers” (Blears *et al.* 1998, Muller *et al.* 1999).

Pre amplificación (PRC + 1): Se realiza una primera PCR (preselectiva), usando cebadores oligonucleótidos complementarios al adaptador y a los sitios de restricción, más un nucleótido selectivo (Blears *et al.* 1998)

Amplificación selectiva (PCR +2): Los productos de la amplificación preselectiva se someten a otra PCR, y nuevamente se selecciona un subconjunto de fragmentos. Generalmente, en la segunda amplificación selectiva se agregan dos nucleótidos más a

los “primers”

2.4.2. Ventajas del Método

La cantidad de DNA requerida es poca, debido a que combina la generación de fragmentos por medio de enzimas de restricción y la amplificación con PCR.

El número de polimorfismos por reacción es mayor que el obtenido con RFLP, puesto que genera un mayor número de bandas. Por otra parte no es necesario conocer las secuencias del genoma de la especie estudiada. (Vos *et al.* 1995, Blears *et al.* 1998, Muller *et al.* 1999).

De igual manera Vos *et a.* (1995) plantean que la preamplificación seguida de una amplificación disminuye el ruido de fondo en la lectura, puesto que se eliminan bandas que son producto de errores en el apareamiento de los “primers”, lo cual sucede cuando se hace una amplificación, igualmente se reduce el número de fragmentos amplificados, por lo que se consideran que es una técnica altamente reproducible.

2.4.3 Marcadores moleculares en identificación clonal

Los datos moleculares constituyen una aproximación adecuada para determinar los procesos que configuran la estructura genética de una especie, pues proporcionan no solo información sobre la distribución actual de la diversidad genética neutral y los procesos que actúan sobre ella (flujo génico, deriva, endogamia), sino también sobre la historia de la población; en particular sobre los patrones geográficos y la importancia del aislamiento histórico (Mortiz 1999).

Los marcadores genéticos han sido utilizados como instrumento de múltiples aplicaciones como son la conservación y el mejoramiento genético de especies forestales, pues permiten obtener un perfil de la huella genética (*fingerprints*) de cada uno de los individuos y esta a su vez permite la identificación de los clones en una especie; el uso de estas herramientas y los ensayos de progenie han aumentado la eficiencia en la selección de árboles *plus* que presenten mayores tasas de crecimiento y calidad de la madera (Ajmone *et al.* 2001, Araya *et al.* 2005).

Dentro de estos marcadores moleculares encontramos los RAPD que han sido utilizados en la identificación y discriminación de clones, variedades y cultivariedades entre los que se destacan los trabajos realizados en *Picea sitchensis* (Van de Ven & McNicol 1995), *Cryptomeria japonica* (Takata & Shiraishi 1996, Goto *et al.* 1999), *Picea abies* (Scheepers *et al.* 1997) y *Pinus thunbergii* Parl (Goto 1998). De igual manera estos marcadores han sido utilizados para establecer y medir la relación genética existente entre clones (Norwati *et al.* 1999). A pesar que esta técnica ha demostrado ser de gran utilidad en la identificación clonal presenta problemas de reproducibilidad; es por esto que 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 *Tectona grandis* (Isoda *et al.* 2000).

La confirmación de la estabilidad genética e identidad clonal, de individuos clonales propagados *In Vitro* durante largos periodos de tiempo, es otro de los objetivos para el cual se han utilizado los marcadores RADP (Karp 2000, Gupta & Rao 2002).

Los marcadores RAPD fueron también empleados en *Pinus patula* para evaluar tres genotipos de diferentes familias; comparando las plantas donadoras y las plantas producidas a través de embriogénesis somática; con doce “primers”, demostrándose la completa homología entre las plantas donantes y las plantas obtenidas *in vitro* al igual que la uniformidad entre los clones de los diferentes genotipos (Malabadi *et al.* 2006).

Raina *et al.* (2001) comprobaron la utilidad de los marcadores RAPD para la evaluar la integridad genética de plantas derivadas de meristemas.

Los marcadores moleculares RAPD fueron usados en el género *Castanea* para establecer la identidad clonal de cuatro híbridos que fueron propagados *in vitro*, durante cuatro años y que fueron aislados de las mismas plantas madre, contra las cuales fueron comparados; haciendo uso de 20 “primers” se comprobó que no existe ninguna diferencia entre el material donador y el propagado *in vitro* (Carvalho *et al.* 2004).

El trabajo desarrollado por Watanabe *et al.* (2004) en teca (*Tectona grandis*), permitió discriminar genotipos entre clones de árboles plus, usando marcadores moleculares RAPD; donde se obtuvo como resultado un total de 24 árboles plus con 23 genotipos diferentes, con probabilidades muy bajas que estos se repitan en la población; sin embargo se evidencio que uno de los genotipos se encontraba representado por dos individuos, los autores proponen que este evento se presenta cuando los individuos tienen origen similar (Keil & Griffin 1994, Van de ven & McNicol 1995, Goto *et al.* 1999)

Albert *et al.* (2003) evaluaron la eficiencia de los marcadores RAPD y AFLP en *Vaccinium myrtillus* para la identificación de clones, teniendo en cuenta la distribución espacial de estos, para poder de esta manera explicar la dinámica y evolución de la población. Con estos dos tipos de marcadores se diferenciaron un total de 32 clones del un total de 112 muestras analizadas; teniendo en cuenta los resultados se propone, que los clones identificados como tal, representan los individuos fundadores de la población y que a pesar de estar dispersos geográficamente, permanecen puros, incluso después de los eventos de propagación. Estableciendo que las distancias genéticas entre los pares de clones no están relacionadas con la distancia espacial; lo cual indica que la variación estuvo distribuida en toda el área de estudio. Según los resultados obtenidos se concluye que estas herramientas moleculares son de gran utilidad para determinar el tamaño, la forma y la distribución de la población, elementos que permiten establecer su evolución en el tiempo.

Haciendo uso de los marcadores moleculares RAPD e ISSR se realizó la identificación de 48 clones de árboles plus de *Tectona grandis*, el material evaluado fue seleccionado de diferentes zonas de la india y suministrado por el banco nacional de germoplasma. En este estudio se utilizaron diez “primers” para RAPD y cinco para ISSR; los resultados obtenidos muestran una amplia base genética presente en los árboles plus, los cuales fueron escogidos de diferentes tipos de bosque de teca, en diferentes geo-climas del país; (Narayanan *et al.* 2007). Cabe destacar que la agrupación de los individuos no coincide con su distribución geográfica, lo cual puede indicar una base genética común entre las poblaciones o un flujo de genes entre las poblaciones de teca (Narayanan *et al.* 2007)

2.5. Certificación clonal

La certificación de un clon forestal refleja las características únicas de cada individuo. Brick & Sivolap (2003) plantean que un genotipo certificado es aquel en el cual la fórmula del estado alélico o arreglo del loci refleja la especificidad del genotipo dado, permitiendo de esta manera la identificación y diferenciación de los demás.

Los marcadores moleculares pueden ser aplicados a programas existentes evaluando la diversidad genética, identificación de híbridos y progenies en cruzamiento controlados; como ejemplo de esto se presenta el caso de *Eucalyptus globulus* y *Eucalyptus nitens*, donde se utilizaron los marcadores moleculares para verificar el proceso de multiplicación e identificación de clones, familias producidas por cruzamiento intra- específicos e intra-específicos. Así mismo fue evaluado el costo/beneficio de la certificación genética con muy buenos resultados (Becerra et al. 2009). De igual forma la huella genética obtenida mediante los marcadores moleculares se utiliza 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 (Araya et al. 2005).

Combinar diferentes tipos de marcadores moleculares para el análisis de la estructura poblacional y clonal, así como para la certificación de las especies forestales es otra de las estrategias empleadas para contribuir al conocimiento de las mismas y poder establecer planes de conservación más eficientes. En trabajos como el de Nkongolo et al. (2005) se utilizan los marcadores ISSR y RAPD para certificar tres especies de Picea (*P. mariana*, *P. glauca*, *P. engelmannii*) y sus posibles híbridos reportados en la literatura, los cuales se establecieron por medio de caracteres morfológicos. Pese a que el nivel de polimorfismo detectado por los marcadores RAPD fue inferior al detectado por los ISSR (53% y 70% respectivamente), estos permitieron diferenciar claramente la pureza genotípica de cada una de las especies, así como establecer que uno de los híbridos reportados no era tal, pues solo presenta características de uno de los parentales; estos resultados fueron confirmados por medio de análisis citológicos.

Los marcadores microsatélites son otra herramienta molecular de aplicación práctica en el sector forestal, que permiten diferenciar genotipos únicos dentro de una misma especie. Este es el caso de *Quercus pirenaica*, donde se llevó a cabo el análisis de la diversidad genética de una población que presenta dos distribuciones espaciales; haciendo uso de nueve marcadores microsatélites se identificaron 14 clones con genotipos únicos. Para ninguno de los microsatélites se evidenció un coeficiente de endogamia significativo diferente de cero; de esta manera se consiguió identificar 194 genotipos únicos de 213 árboles analizados, en los cuales se encontró una diversidad genética entre los clones cercana a uno ($D= 0.9989$) (Valbuena *et al.* 2008); los resultados dejan en evidencia el poder de adaptación de las poblaciones a las diferentes condiciones ambientales donde se encuentran, presentándose una alta variabilidad entre poblaciones de una misma especie con diferentes distribuciones.

Un aspecto importante a tener en cuenta en el momento de evaluar la diversidad genética existente en una población es la distribución espacial, respecto al gradiente de distribución altitudinal; en la actualidad los marcadores microsatelites están siendo utilizados para este fin Tripliana *et al.* (2007) en *Eucalyptus urophylla* y Zhang *et al.*, (2006) en *Quercus aquifolioide*; revelaron un alto grado de variabilidad en las especies, está se explica por las adaptaciones que los individuos de cada una de las poblaciones ha desarrollado ante las distintas condiciones ambientales que se presentan en las diferentes altitudes. Según los datos obtenidos los autores recomiendan establecer unidades de conservación teniendo en cuenta los rangos de distribución altitudinal, permitiendo de esta manera conservar la mayor diversidad de las especies.

El poder de estos marcadores para establecer la diversidad existente en las poblaciones, así como el parentesco, según las historias evolutivas de las especies y los planes de manejo establecidos se evidenciaron en los estudios realizados por Oliveira *et a.l* (2007) en *Caesalpinia echinata*, en la cual se observaron altos niveles de heterogeneidad; resultados similares fueron encontrados en *Fagus sylvatica*, al evaluar dos poblaciones con diferentes intensidades de manejo (Buiteveld *et al.* 2007).

2.6. Variación intraclonal

La propagación vegetativa permite generar progenies en las que se captura todo el potencial genético, aditivo y no aditivo, de la planta donante. Sin embargo, en ocasiones se evidencia un cambio en las características fenotípicas seleccionadas, viéndose afectada la productividad, este cambio se le atribuye a la variabilidad intraclonal. Es por esto que para cualquier método de propagación vegetativa que se aplique, es muy importante obtener plantas en las que se mantenga la fidelidad clonal (Park *et al.* 1998).

Cabe anotar que la variación genética puede presentarse entre los clones que provienen de diferentes partes del árbol donante (Ahuja & Libby 1993) y por tanto trasladarse a la progenie vegetativa. Por ello, la detección temprana de la variación genética intraclonal es fundamental cuando se quiere mantener la pureza de los clones propagados.

Distintos tipos de marcadores de DNA (RAPDs, SSRs, AFLPs) pueden ser apropiados para la evaluación de esta variación, con el fin de identificar las plantas donantes y hacer un seguimiento de su descendencia clonal.

Los marcadores de tipo AFLP han sido utilizados para diferentes estudios sobre diversidad genética, mapeo e identificación clonal. Particularmente por su reproducibilidad y porque generan más marcadores polimórficos por reacción. Esta técnica se ha utilizado para determinar la estabilidad genética de material propagado vegetativamente y procedente de cultivo *in vitro* (Engelborghs *et al.* 1998, Chen *et al.* 1999, Vendrame *et al.* 1999, Hornero *et al.* 2001).

Douhovnikoff *et al.* (2003) haciendo uso de los marcadores AFLP determinaron el nivel de variación de los *fingerprints* entre y dentro de los clones de *Salix exigua*, de igual manera determinaron las posibles causas de la variación intraclonal existente.

Para poder identificar exactamente los clones dentro de la población total (86 plantas) los autores establecieron un umbral, el cual se estableció en 0.983; teniendo en cuenta este valor se identificaron un total de 11 clones, donde uno de estos estaba representado en un 43% del total de la muestra. Los autores plantean que la variación encontrada puede

ser una variación somaclonal o somática que se presenta por la forma en la cual son propagadas las especies.

2.7. Biotecnología en *Gmelina arborea*

Las técnicas de biotecnología como cultivo de tejidos *in Vitro* también han sido evaluadas en *Gmelina arborea*, Valverde *et al.* (2004) en Costa Rica evaluaron la micropropagación de clones a partir de cruces controlados. Los segmentos nodales de las plántulas se colocaron en medios de cultivo MS con diferentes concentraciones de benciladenina (BA), y diferentes concentraciones de ácido indolbutírico (AIB). En estos ensayos se evidenció una diferencia significativa entre los tratamientos respecto a la tasa de inducción de brotes entre cada una de las familias y entre los diferentes genotipos evaluados.

La transformación genética mediada por *Agrobacterium rhizogenes*, es otra de las herramientas biotecnológicas, aplicada en esta especie con el fin de generar mayor producción de raíces y de esta manera obtener mayor producción de metabolitos secundarios, los cuales son de gran interés medicinal (Dhakulkar *et al.* 2005)

A nivel molecular Araya *et al.* (2005), evaluaron las relaciones genéticas en una colección de 29 clones de *Gmelina arborea*, mediante el uso de marcadores AFLP marcados con fluorescencia; seleccionando tres combinaciones de “primers” con base en tres umbrales de detección (75, 135, 200) de intensidad de fluorescencia. El coeficiente de similitud de Jaccard fue determinado para cada uno de los tres umbrales de detección de los marcadores.

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 parentesco con el resto a la colección.

Los valores de similitud de Jaccard más altos fueron del orden de 0,39 y registraron valores promedio para los 29 clones entre 0,24 y 0, 27. Esto indica que la colección de clones de melina estudiada, comparte un 33% de la base genética; lo que sugiere la necesidad de ampliar la base genética de la especie del programa de mejoramiento genético.

Lo anteriormente planteado deja en evidencia que la gestión forestal sostenible, exige el conocimiento de la diversidad presente en las poblaciones, teniendo en cuenta su distribución geográfica y las adaptaciones que cada una de estas ha presentado a los factores abióticos y bióticos de las diferentes regiones donde se distribuyen; con el fin de establecer estrategias de conservación *in situ* y *ex situ* efectivas que permitan mantener la mayor variabilidad en el tiempo

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

Gmelina arborea se caracteriza por tener un rápido crecimiento y una gran adaptabilidad a los ecosistemas tropicales, convirtiéndose en una especie de potencial importancia para el sector forestal en países como Colombia. Sin embargo existe poca información sobre su genética y fisiología, lo cual es fundamental para adelantar programas de mejoramiento genético que permitan obtener nuevos materiales con buena productividad.

El valor de la producción de madera de *G. arborea* depende en gran medida de establecer plantaciones uniformes, de alta calidad de madera y productividad. Es por esto que se hace necesario encontrar los materiales que mejor se adapten a las diferentes regiones, lo que implica evaluarlos en cada región y reproducirlos a gran escala en poco tiempo.

El material existente de Melina en Colombia ha sido introducido de diversas regiones del mundo, sin embargo esto no garantiza que sean de diferentes fuentes de origen y por lo tanto la base genética del material presente en Colombia puede ser estrecha. En los últimos años la empresa PIZANO S.A. ha evaluado cerca de 120 clones de los cuales fueron seleccionados 33 clones dentro del plan de mejoramiento, por su capacidad de enraizamiento, volumen y calidad de madera. Este proceso de selección se ha llevado a cabo durante varios años por lo que existe incertidumbre sobre la identidad de cada uno de los clones, y sobre la diversidad genética presente en la colección; esto se puede presentar debido a que no se tienen claramente identificados los descendientes de una misma línea y puede existir una mezcla de materiales.

De esta manera se hace necesario realizar la caracterización molecular de los clones para poder certificar la identidad genética de las plantas madres que serán utilizadas para propagación masiva y a partir de esta información retomar los ensayos clon/sitio, así como establecer los cruces con mayor potencial de generar clones diferentes, en las sucesivas etapas de propagación dentro del plan de mejoramiento genético.

Adicionalmente, hasta el momento no se conoce que tan amplia es la base genética de los materiales existentes de *G. arborea* en Colombia, para ser utilizados en programas de mejoramiento genético. Teniendo en cuenta que existen estos vacíos, se plantea la necesidad de minimizar la posible repetición de materiales idénticos o muy cercanos genéticamente y certificarlos.

Por todo lo anterior es necesario contar con una herramienta que permita identificar de la manera más precisa posible la identidad de cada uno de los materiales de melina con los que cuenta Pizano S.A. En la resolución de este tipo de problemas, los marcadores moleculares son cada vez más utilizados, permitiendo identificar variedades o clones en especies forestales. Aun en especies con una base genética estrecha es posible encontrar polimorfismos que reflejen las diferencias entre los grupos de individuos. Esta herramienta es actualmente utilizada en especies de importancia económica como eucalipto o pino, no solamente para identificar clones o individuos, sino como parte de programas de mejoramiento genético asistido por marcadores (Araya *et al.* 2005 b).

En Colombia hasta el momento no se han desarrollado estudios referentes a este tema en la especie. Todo lo anterior lleva a concluir que una primera caracterización molecular de los materiales de *G. arborea*, sería de gran utilidad para el sector forestal, no solo en el país sino a escala mundial.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Caracterizar molecularmente clones de *Gmelina arborea* procedentes de los jardines clonales de la empresa Pizano S.A y Camcore (Cooperativa de Recursos de Coníferas de Centro América y México)

4.2. Objetivos específicos

Determinar el nivel de diversidad genética de clones de *Gmelina arborea*, procedentes de los jardines clonales mediante el uso de marcadores moleculares AFLP.

Establecer diferencias genéticas entre los materiales de *Gmelina arborea* procedente de la empresa Pizano S.A. y Camcore

Obtener la huella genética para cada uno de los clones por medio de marcadores moleculares AFLP.

5. MATERIALES Y METODOS

Este proyecto se realizó en el laboratorio de Biología Molecular Vegetal de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Pontificia Universidad Javeriana

5.1. Población de estudio

La población de estudio estuvo constituida por 68 clones de *Gmelina arborea*, de los cuales 33 clones pertenecen a los jardines de la empresa Pizano S.A. (procedencias desconocidas) y 35 clones a la colección de Camcore (mantenidos en las plantaciones de Pizano S.A) en la figura 1 y anexo 1 se muestra la procedencia y distribución geográfica del material perteneciente a la colección de Camcore.

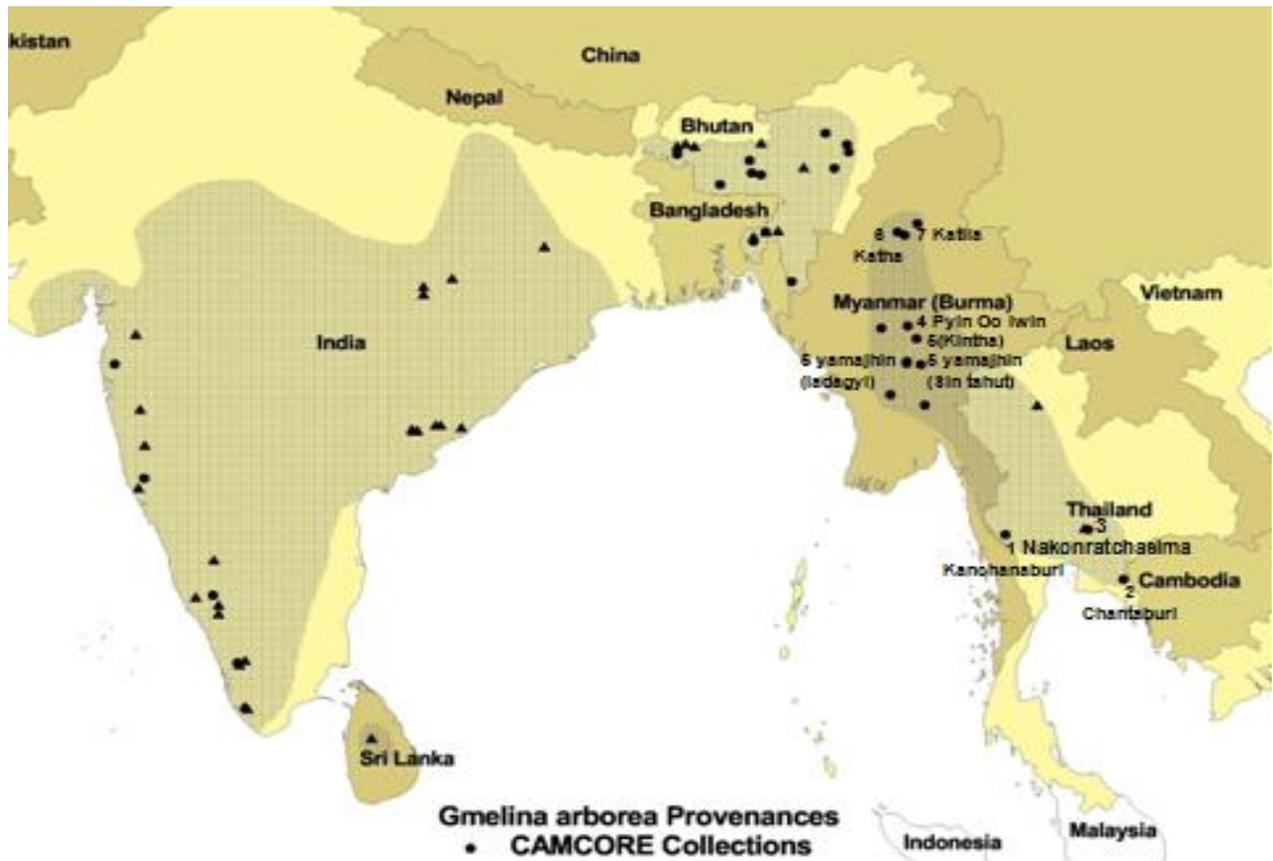


Figura 1. Mapa de distribución geográfica de 35 clones de *Gmelina arborea* colección Camcore

5.2. Material vegetal

Plántulas de *Gmelina arborea* suministradas por Pizano S.A. que se mantuvieron en el laboratorio e invernadero; se tomaron hojas jóvenes completamente desarrolladas y en buen estado fitosanitario que fueron maceradas con nitrógeno líquido.

5.3. Estandarización del protocolo de extracción de DNA

Para la estandarización del protocolo de extracción de DNA se trabajó con diez clones: P15, P51, P53, P54, P60, P66, P79, P91, P112, P129 de la colección de Pizano S.A. Se evaluaron tres protocolos de extracción, dos de estos reportados en la literatura (Doyle & Doyle 1990 modificado y Stefenon *et al* (2004) y un kit comercial (DNeasy Plant Mini Kt de Qiagen - anexo 2).

Teniendo los DNA extraídos por los tres métodos, se realizaron pruebas de pureza y concentración; las cuales fueron tomadas con el espectrofotómetro Nanodrop 1000 marca Thermo scientific, a través de la relación de densidad óptica de absorbancia A260/A280nm. De igual manera se verificó la integridad del DNA en geles de agarosa al 0.8% teñidos con bromuro de etidio (Bet) a una concentración de 5 mg/ml, estos geles fueron visualizados en un transiluminador y documentados digitalmente.

5.4. Amplificación con marcadores moleculares AFLP

El DNA de las muestras fue analizado utilizando el "kit" AFLP Analysis System®, de Invitrogen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Este análisis se realizó en cuatro pasos:

5.4.1. Digestión del DNA

Antes de iniciar la digestión, las muestras de DNA fueron llevadas a una concentración de 100 ng/μl. Luego, se emplearon dos enzimas de restricción del “kit”; *MseI* que reconoce cuatro pares de bases en el sitio de corte (corte frecuente) y *Eco-RI* que reconoce seis pares de bases (corte raro). Para esto se preparó una reacción con buffer 5X a una concentración final de 1X, 1.25 u/μl de concentración final de la mezcla de las enzimas de restricción, DNA a una concentración final de 40 ng/μl y agua destilada hasta completar un volumen final de 12.5 μl para cada una de las muestras.

Esta mezcla fue incubada a 37°C durante dos horas, e inactivada a 70°C por 15 minutos y conservada en frío.

5.4.2. Ligación del DNA

En este paso se ligaron los adaptadores específicos a los sitios cohesivos resultado de la digestión de DNA con las enzimas de restricción, con el fin de generar secuencias conocidas para la amplificación. La reacción de ligación estuvo compuesta de 12μl de solución de adaptadores mas 0.6 u/μl concentración final de enzima T4 ligasa, para un volumen final de 12.5μl por reacción. Este volumen fue agregado a la reacción de digestión y luego incubado a 20°C por dos horas. De la reacción resultante de digestión – ligación, se realizó una dilución 1:5 en buffer TE para ser utilizada en la pre amplificación.

5.4.3. Preamplificación (PCR+1)

Para esta amplificación se emplearon iniciadores con secuencias complementarias a cada uno de los iniciadores, mas una base nucleotídica adicional en el extremo 3'. En esta reacción solo fueron amplificados los fragmentos en los cuales la base nucleotídica que flanquea el sitio de restricción es complementaria al nucleótido seleccionado.

Para esta reacción se preparó una mezcla que contenía DNA a una concentración de 50 ng/μl (2.3μl de la dilución de la reacción digestión-ligación), 20μl de pre-amp primer mix, PCR Buffer 10 X AFLP a una concentración final de 1X y 1U de *taq* polimerasa en un volumen final de 25μl.

Se llevó a cabo la PCR en un termociclador MJ Research PTC 100, bajo el siguiente perfil de amplificación: 94°C por 30 segundos, 56 °C por 60 segundos y 72°C por 60 segundos, por 20 ciclos. Una vez finalizada la reacción de PCR, se realizaron diluciones 1:5 del producto de esta amplificación.

5.4.4. Amplificación selectiva (PCR+2)

Para este paso se utilizaron iniciadores que presentaban la misma secuencia de los iniciadores de preamplificación más dos o tres bases nucleotídicas de selección en los extremos 3'. Para este paso se prepararon dos mezclas; la primera estaba compuesta por un iniciador *EcoRI* a una concentración final de 0.278 ng/ μ l, iniciador *MseI* 1.50 ng/ μ l de concentración final y agua destilada hasta completar un volumen final de 5 μ l por reacción. La segunda mezcla contenía buffer de PCR 10X a una concentración final de 1X, 0.5 U de *taq* polimerasa y agua hasta completar un volumen final de 10 μ l.

Posteriormente, para cada reacción de PCR+2 se mezclaron 5 μ l de la mezcla uno, 10 μ l de la mezcla dos y 5 μ l de la dilución de la PCR+1 por cada una de las muestras. La amplificación de DNA se llevó a cabo en un termociclador MJ Research PTC 100, con el siguiente perfil de amplificación: un ciclo inicial de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 65°C y 60 segundos a 72 °C. Luego, se repitieron 25 ciclos reduciendo la temperatura de anillamiento en 0.7°C en cada ciclo por 12 ciclos. Los productos de amplificación fueron almacenados a -20°C.

Con el fin de escoger aquellas combinaciones que resultaran más polimórficas y generaran mayor información genética de los clones y ser evaluadas con todos los individuos, se ensayaron once combinaciones de “primers” para amplificación selectiva, que se muestran en la tabla 1. Cada reacción se realizó por duplicado para verificar la reproducibilidad de la técnica.

Tabla 1. Combinaciones de “primers” *Eco*-RI x *MseI* para el análisis de clones de *Gmelina arborea* mediante AFLP

| <i>Eco- RI</i> | <i>Mse</i> |
|--------------------|----------------|
| <i>Eco- RI</i> AGG | <i>Mse</i> CAA |
| <i>Eco- RI</i> AGC | <i>Mse</i> CTG |
| <i>Eco- RI</i> ACT | <i>Mse</i> CAG |
| <i>Eco- RI</i> ACA | <i>Mse</i> CAC |
| <i>Eco- RI</i> CAA | <i>Mse</i> ACG |
| <i>Eco- RI</i> AG | <i>Mse</i> CTC |

| | |
|--------------------|----------------|
| <i>Eco- RI AT</i> | <i>Mse CTC</i> |
| <i>Eco- RI ACT</i> | <i>Mse CTC</i> |
| <i>Eco- RI ACC</i> | <i>Mse CTA</i> |
| <i>Eco- RI ACG</i> | <i>Mse CTC</i> |
| <i>Eco- RI ACT</i> | <i>Mse CTT</i> |

Los productos de amplificación fueron separados en geles de poliacrilamida al 6%, corridos en una cámara de electroforesis vertical Sequin-Gen GT Sequencing Cell de BioRad, a 110W durante 1 hora y 30 minutos a una temperatura de 55°C. Los geles fueron teñidos con nitrato de plata siguiendo el protocolo de tinción (anexo 3).

5.5. Variación intra clonal

Con el fin de establecer si existe variación genética significativa al interior de los clones, respecto a las diferencias presentes entre clones, se realizó la amplificación de DNA mediante marcadores AFLP con las tres combinaciones ya definidas (*Eco- RI ACT X Mse CTC*, *Eco-RI ACG X Mse CTC*, *Eco-RI AGG X Mse CAA*) ; para la evaluación de cinco individuos de los clones P48 (P48. 2, P48.3, P48.5, P48.6, P48.7) y P37 (P37.1, P37.2, P37.6, P37.7, P37.8) esta prueba se realizó por duplicado para verificar la reproducibilidad de la técnica.

Para establecer si las diferencias presentadas dentro y entre los clones era estadísticamente significativa se realizó un análisis de varianza ANOVA, teniendo en cuenta la matriz de similitud de Dice, con una significancia de 0.05

5.6. Perfiles genéticos o huella genética

Para la determinación del perfil genético de los 68 clones de *Gmelina arborea* se utilizaron tres combinaciones de primer de AFLP (*Eco- RI ACT X Mse CTC*, *Eco-RI ACG X Mse CTC*, *Eco-RI AGG X Mse CAA*). Se tuvo en cuenta aquellas bandas que fueran claras, consistentes y de fácil distinción, en el momento de la automatización de la técnica, en cada una de las repeticiones.

En este caso se realizó la identificación de los descriptores moleculares (combinaciones de “primers”) con letras (A, B, C) y los loci con números, que representan los pesos moleculares de cada una de las bandas.

5.7. Análisis de información

El análisis de los datos obtenidos de las amplificaciones mediante marcadores AFLP fue llevado a cabo mediante el establecimiento de una matriz binaria, donde la presencia de bandas fue codificada como 1 y la ausencia 0. Con estos datos se procedió manualmente a establecer el porcentaje de polimorfismo generado en cada una de las combinaciones, teniendo en cuenta el número de bandas polimorfitas sobre el total de bandas.

Posteriormente estos datos fueron analizados con el programa estadístico R- gui, con el cual se construyó la matriz de similitud utilizando el índice de Dice.

Una vez obtenida la matriz de similitud, los clones fueron agrupados en clusters por medio de un dendrograma, usando el algoritmo de agrupamiento UPGMA (unweigthed pair group method), el cual permitió visualizar en dos dimensiones las diferencias entre los materiales evaluados.

Con el fin de verificar las agrupaciones generadas se realizó un análisis de coordenadas principales, que toma en cuenta aquellas variables que expliquen y generen mayor información de la variabilidad, explicada en porcentajes; este análisis se realizó con el programa Gen Alex (Peakall & Smouse, 2006).

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Extracción de DNA

Los estudios de diversidad genética en plantas, utilizando herramientas biotecnológicas como los marcadores moleculares, plantean la necesidad de tener métodos precisos y eficientes de extracción de DNA los cuales dependen directamente de la especie. Por este motivo se evaluaron tres protocolos de extracción.

El material colectado fue macerado con nitrógeno líquido, que genera la separación de las células unidas mediante pectina, de igual manera permite el rompimiento de las paredes por daño mecánico y las lisis de protoplastos (Boiteux *et al.*1999).

Empleando el material vegetal de diez clones se evaluó la eficiencia de tres protocolos de extracción, teniendo en cuenta la pureza, cantidad e integridad del DNA obtenido. La mayor pureza se obtuvo con el protocolo de Stefenon *et al.* (2004), con valores promedio de $A_{260}/A_{280} = 1.76$, el valor más bajo se obtuvo mediante el protocolo de Doyle & Doyle 1990 con valores promedio de $A_{260}/A_{280} = 1.45$.

Con respecto a la cantidad del DNA extraído con el protocolo de Stefenon *et al.* (2004) se consiguieron 897.5 ng/ μ l en promedio, concentraciones altas en comparación con los otros dos procedimientos de extracción 87.34 ng/ μ l con el protocolo de Doyle & Doyle (1990) y 45 .67 ng/ μ l con el kit de Qiagen.

Al evaluar la integridad del DNA extraído en los geles de agarosa se evidenció un DNA altamente degradado con los protocolos de Doyle & Doyle (1990) y el kit de Qiagen. La degradación observada en algunas de las muestras con estos dos protocolos puede atribuirse a la acción rápida de nucleasas, liberadas al iniciarse el proceso natural de degradación de los tejidos (Hills *et al.* 1990).

Las diferencias básicas entre las metodologías aplicadas para la extracción de DNA, en este estudio radican en el número de pasos empleados en el proceso de extracción y la composición del *buffer* de lisis; el cual generalmente está compuesto de un agente estabilizador del pH, una sal para precipitar las proteínas del DNA, un detergente para solubilizar las membranas e inactivar algunas enzimas y un inhibidor de DNAsas (Bered 1998).

En la purificación del DNA extraído se debe tener en cuenta que este se encuentra ionizado. Los grupos fosfato de carga negativa se encuentran distribuidos a lo largo de la cadena DNA y al agregar una sal como el acetato de potasio, se forma una sal sódica de DNA la cual tiene la capacidad de aumentar el poder iónico de la solución facilitando la precipitación alcohólica de DNA por medio del isopropanol (Gonzalez *et al.* 1995).

En el protocolo de Stefenon *et al.* (2004), se realizaron dos lavados, uno de ellos con Acetato de sodio y el otro con acetato de potasio e isopropanol, lo que representa una ventaja frente al método de Doyle & Doyle 1990 donde se realiza un solo lavado

Uno de los mayores problemas que se encuentran al momento de aislar DNA son los compuestos fenólicos y los metabolitos secundarios que presentan la especies vegetales, puesto que estos degradan el DNA, al igual que inhiben la acción de la *taq* polimerasa, la cual es fundamental en los procesos que involucran PCR (Molinari 2001).

Para la remoción de estos metabolitos secundarios y la eliminación de lípidos se requiere de métodos orgánicos, en el caso del protocolo de Stefenon *et al* (2004) se adicionaron dos lavados con cloroformo- isoamilico 24:1, el cual remueve los residuos fenólicos presentes en la muestra y disuelve componentes orgánicos como clorofila e hidrofenoles. Por su naturaleza apolar captura lípidos y evita la precipitación de proteínas hidrofóbicas denaturadas (Chaves *et al.* 1995).

Teniendo en cuenta los valores de pureza, cantidad y la integridad de DNA obtenido con el protocolo de Stefenon *et al* (2004), se estableció que este método era el más indicado para realizar la extracción de DNA de los 68 clones de *Gmelina arborea*.

6.2. Variación intraclonal

Para establecer si existían diferencias entre los individuos de un mismo clon se tomaron cinco individuos del clon 37 y cinco del clon 48 para aplicar los marcadores AFLP con las combinaciones elegidas; se construyó la matriz de presencia y ausencia, con la cual se calcularon las distancias genéticas entre clones mediante el índice de Dice y se construyeron los dendogramas. En la figura 2 se observa que el individuo 37_6 dentro del clon 36 presenta diferencias respecto a los demás, igual que el individuo 48_3 dentro del clon 48; estos resultados sugieren que los individuos analizados presentan variación intraclonal.

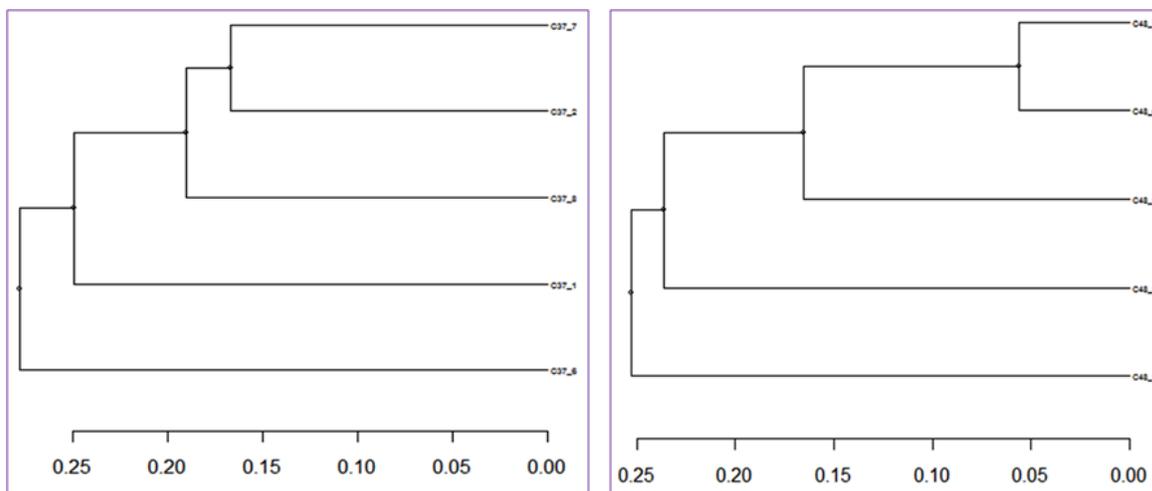


Figura 2. Dendrogramas usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genéticas presentes entre los individuos del clon 37 y los individuos del clon 48 de *Gmelina arborea* mediante marcadores AFLP.

Para establecer si las diferencias presentadas dentro y entre los clones era estadísticamente significativa se realizó un análisis de varianza ANOVA, teniendo en cuenta la matriz de similitud de Dice, con una significancia de 0.05, donde se puede observar las diferentes fuentes de variación, las sumas de cuadrados, los grados de libertad (DF) el cuadrado medio, el estadístico F calculado y el p-valor (tabla 4).

Tabla 4. Resultados análisis de varianza ANOVA para variación intra clonal de clones de *Gmelina arborea*

| Fuentes de Variación | Suma de cuadrados | gl | Media cuadrática | F | Sig. p-valor |
|----------------------|-------------------|----|------------------|-------|--------------|
| Entre clones | 0,038 | 1 | 0,038 | 9,260 | 0,007 |
| intra clones | 0,074 | 18 | 0,004 | | |
| Total | 0,112 | 19 | | | |

El P-valor establece que existen diferencias estadísticamente significativas entre los clones y dentro de clones; sin embargo cuando se analiza la media cuadrática asociada a la variación entre e intra clonal, se observa que la variación entres clones es superior

(0,038) a la encontrada al interior de los clones (0.004), de esta manera se plantea que la colección *Gmelina arborea* evaluada, presenta un grado de variación intraclonal.

Las diferencias presentadas entre clones, podrían estar relacionadas con los cambios constantes, drásticos o parciales en la constitución genética, experimentados por las poblaciones forestales a pesar de su largo ciclo de vida. Por otra parte se desconoce completamente el potencial de variabilidad y las características que estos genotipos pueden mostrar en condiciones impuestas por su medio ambiente nativo o exótico (Murillo *et al.* 2003).

6.2.1. Efecto clonal

El efecto clonal, es un fenómeno importante a tener en cuenta en este análisis, aunque no es una fuente de variación genética asociada directamente con los clones, experimentalmente se ha probado que esta es una importante fuente de variación entre propágulos. En los casos en los que rametos se derivan de varias partes diferentes de la copa de un árbol *plus* u *ortet* maduro, la variación asociada con la clonación puede ser tan grande que la variación dentro del clon (intraclonal) puede exceder la variación interclonal de la población (Jara 1995).

Cuando los rametos se originan de árboles *plus* jóvenes, la variación intraclonal y el efecto clonal generalmente es pequeño (Jara 1995).

Por lo tanto el efecto clonal tiene una gran importancia debido a que incrementa la variación del error, disminuyendo así la posibilidad de separar los efectos genéticos clonales de otros efectos no genéticos. Si se usa material juvenil el efecto clonal es de menor importancia (Jara 1995).

Los resultados dejan en evidencia que los AFLP son un buen marcador para estudios de clonalidad donde se reconoce que los clones no son siempre idénticos y el grado de diferencia genética intra-clonal puede variar en las especies (Lasso 2008).

6.3. Análisis con marcadores AFLP

Para cada una de las combinaciones se realizó una matriz binaria, codificando la presencia y ausencia de bandas como 1 y 0 respectivamente, para de esta manera obtener el número total de bandas por combinación, las bandas polimórficas y el porcentaje de polimorfismos (tabla 3).

Tabla 3. Número total de bandas, número de bandas monomórficas, número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con marcadores AFLP.

| Combinación | Número total de bandas | Bandas monomórficas | Bandas polimórficas | Porcentaje de polimorfismo % |
|---------------------------------------|-------------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------------------|
| <i>Eco-RI</i> ACG x <i>Mse</i> CTC | 119 | 0 | 119 | 100 |
| <i>Eco-RI</i> ACT x <i>Mse</i> CTC | 59 | 0 | 59 | 100 |
| <i>Eco-RI</i> AGG x <i>Mse</i> CAA | 114 | 0 | 114 | 100 |
| <i>Eco-RI</i> AT x <i>Mse</i> CTC | 78 | 3 | 75 | 96.15 |
| <i>Eco-RI</i> ACC x <i>Mse</i> CTA | 38 | 0 | 38 | 100 |
| <i>Eco-RI</i> AGC X <i>Mse</i> CTG | 86 | 4 | 82 | 95.34 |
| <i>Eco-RI</i> ACT X <i>Mse</i> CAG | 12 | 5 | 7 | 58.33 |
| <i>Eco-RI</i> ACA X <i>Mse</i> CAC | 13 | 3 | 10 | 76.92 |
| <i>Eco-RI</i> CAA X <i>Mse</i> ACG | 9 | 6 | 3 | 33.33 |
| <i>Eco-RI</i> AG X <i>Mse</i> CTC | 7 | 4 | 3 | 42.85 |

| | | | | |
|---|-----|---|-----|-------|
| <i>Eco-RI</i> ACT X <i>Mse</i> CTT | 120 | 4 | 116 | 96.66 |
|---|-----|---|-----|-------|

Teniendo en cuenta el porcentaje de polimorfismo presentado, el análisis de amplificación de DNA de 68 clones de *Gmelina arborea* perteneciente a dos colecciones (Pizano S.A y Camcore), se basó en 355 loci obtenidos con tres combinaciones de “primers” (***Eco-RI* ACT X *Mse* CTC, *Eco-RI* AGG X *Mse* CAA, *Eco-RI* ACG X *Mse* CTC**); 353 loci fueron polimórficos El total de polimorfismo obtenido fue de 99.4% (Tabla 4)

Tabla 4. Porcentaje de polimorfismo obtenido en 68 clones *Gmelina arborea* con marcadores AFLP.

| | | Porcentaje de polimorfismo |
|----------------------------|-----|-----------------------------------|
| Bandas polimórficas | 353 | 99.4% |
| Bandas monomórficas | 2 | 0.56% |
| Total de bandas | 355 | |

6.3.1. Análisis de diversidad genética

El análisis de cluster para los 68 individuos de la colección de Pizano S.A. y Camcore, está basado en 355 marcadores AFLP, con los cuales se realizó el cálculo de las distancias genéticas entre clones, según el índice de Dice.

En el dendrograma (Figura 3) obtenido se puede observar como las dos colecciones se separaron a una distancia genética de 0.7 y no existe una relación de individuos entre estas. Los clones de la colección de Pizano S.A. (Piz) se agrupan a una distancia de 0.401; La colección de Camcore (Cam) presenta una distancia de 0.385 (Figura 3).

Dentro de la colección de Pizano (Piz) se observan dos subgrupos grandes Piz A y Pz B (0.401). El sub grupo Piz A lo conforman los clones P48, P49, P51, P53, P54, P55, P56, P60, P61, P62, P64, P65, P66, P67, P68, P75, P78, P79, P84, P86, P91, P94, 109, 112,

129, agrupados a una distancia de 0.395. Los clones P1, P15, P24, P31, P32, P37, P38, P40, hacen parte del subgrupo Piz B, que se agrupan a una distancia de 0.28 (Figura 3).

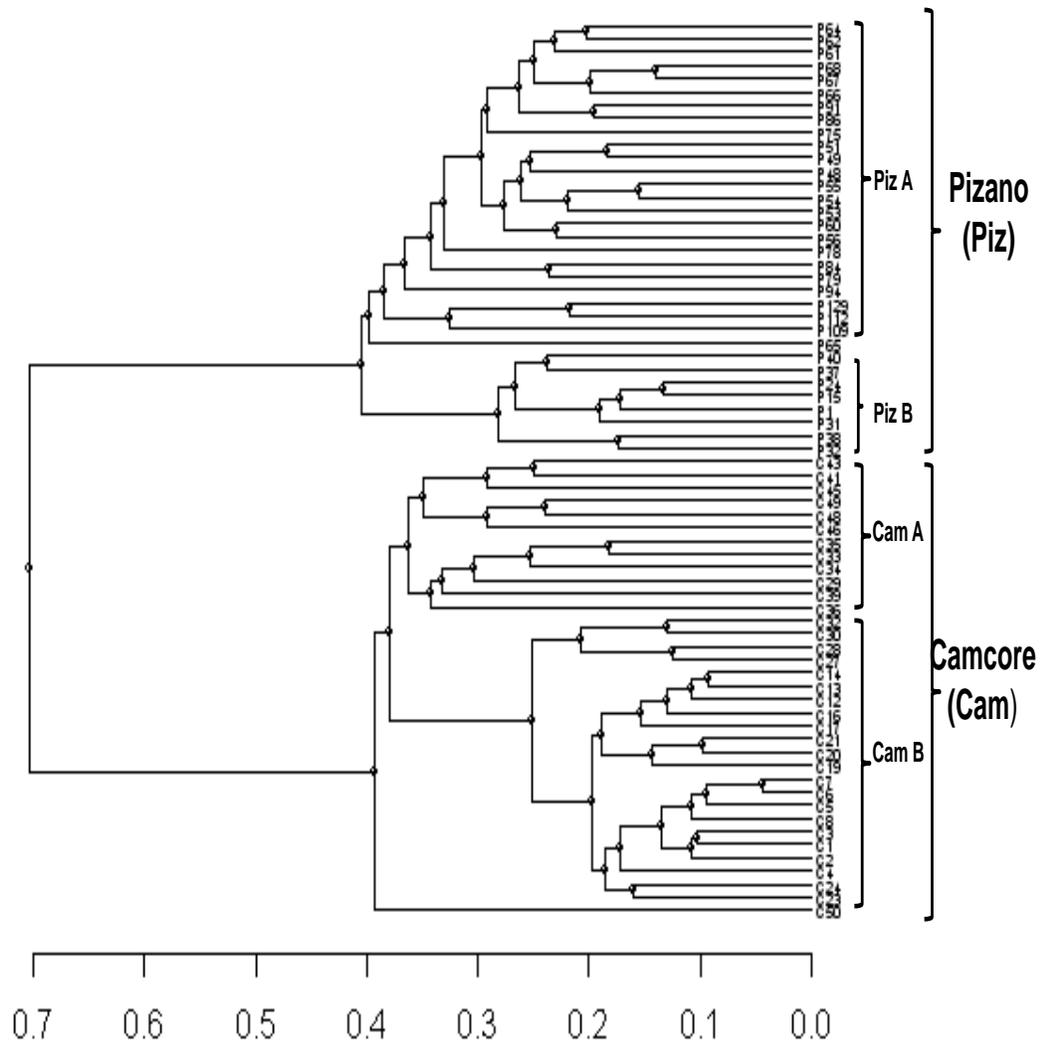


Figura 3. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genéticas presentes entre los 68 clones de *Gmelina arborea* mediante marcadores AFLP de la colección Pizano S.A. y Camcore

La colección de Camcore (Cam) se divide en Cam A donde sus clones se agrupan, a una distancia de 0.365, los clones C27, C28, C29, C30, C32, C33, C34, C35, C36, C39, C41, C43, C45, C46, C48, C49 y Cam B (0.250), con los clones C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C12, C13, C14, C16, C17, C19, C20, C21, C23 Y C24, (Figura 3). Un poco más distante pero igualmente relacionado con la colección de Camcore se observa el clon C50 a un distancia de 0.39.

6.3.2. Análisis de coordenadas Principales Camcore – Pizano S.A

El análisis de coordenadas principales (PCA) se basa en las frecuencias de los marcadores seleccionados, para esto se toman en cuenta aquellas variables que expliquen y generen mayor información de la variabilidad que por lo general son las tres primeras coordenadas (Crisci & López, 1983).

El análisis de coordenadas principales para los 68 clones de *Gmelina arborea* de las colecciones de Pizano S.A. y Camcore está basado en 355 loci. Las tres primeras coordenadas explican el 87.20 % del total de la variabilidad (Tabla 5).

Tabla 5. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de 68 clones de *Gmelina arborea* colección Pizano S.A. y Camcore

| Percentage of variation explained by the first 3 axes | | | |
|--|----------|----------|----------|
| Axis | 1 | 2 | 3 |
| % | 65,62 | 11,98 | 9,59 |
| Cum % | 65,62 | 77,61 | 87,20 |

La primera coordenada explica el 65.62 % de la variabilidad presente en los clones analizados; este componente permite separar claramente las colecciones de Pizano S.A. y Camcore dejando en evidencia que pertenecen a acervos genéticos diferente (Figura 4).

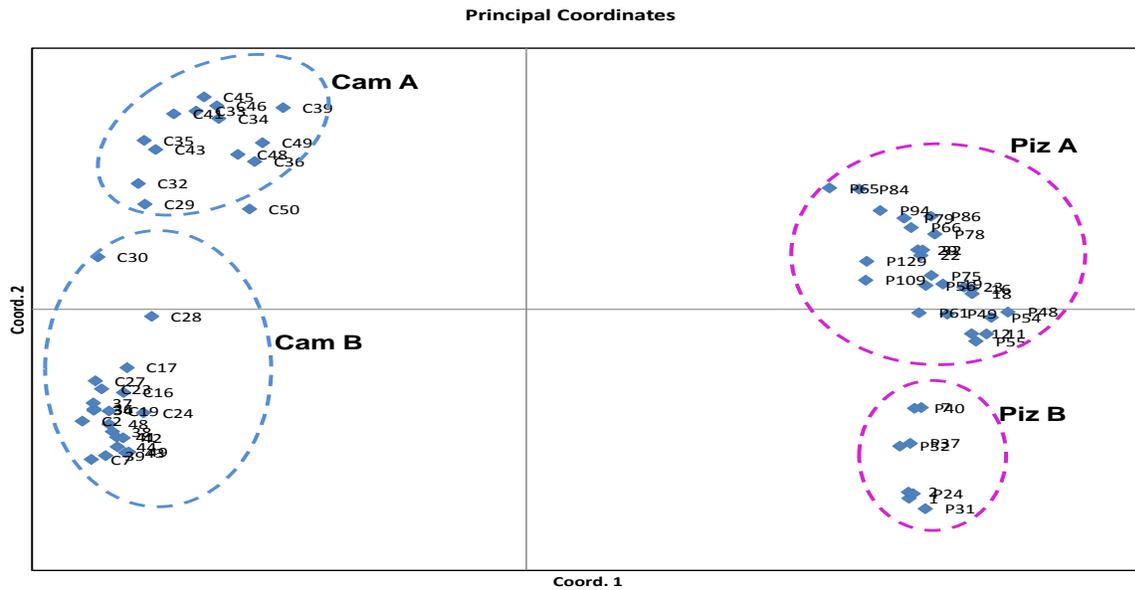


Figura 4. Análisis de coordenadas principales (PCA) 68 clones *Gmelina arborea* colección Pizano S.A (Piz) y Camcore (Cam)

Cada una de las colecciones fue separada en dos subgrupos Piz A – Piz B y Cam A – Cam B; por medio de la segunda coordenada que explica el 11.98% de la variabilidad

La tercera coordenada explica el 9.59% de la variabilidad total (tabla 3). Los resultados obtenidos en este análisis basado en las frecuencias de los marcadores AFLP, concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis de cluster con el coeficiente de Dice.

Teniendo en cuenta las diferencias presentadas en las dos colecciones, respecto a la distancia genética; a continuación se hace la descripción detallada del análisis de diversidad genética y coordenadas principales de cada una de las colecciones

6.4. Análisis con marcadores AFLP Colección Pizano S.A

La amplificación de DNA usando los marcadores AFLP mostró un total de 268 bandas (loci), en 33 individuos de *Gmelina arborea* de la colección del jardín de la empresa Pizano S.A., identificados mediante tres combinaciones de “primers” (Tabla 6). Las bandas presentaron tamaños entre 330 y 92 pares de bases (pb). El mayor número de bandas (102) fue obtenido con la combinación de “primers” *Eco-RI* ACT X *Mse* CTC, el menor número de bandas (65) se evidenció con la combinación *Eco-RI* ACG X *Mse* CTC que a la vez fue 100% polimórfica. Un total de 251 loci generaron el 93.65% de polimorfismo (Tabla 6).

Tabla 6. Numero de bandas y polimorfismo observado en el análisis de DNA de *Gmelina arborea* colección Pizano S.A con marcadores AFLP.

| Combinación de primers | Numero de bandas | Bandas polimórficos | % de polimorfismo |
|------------------------------------|------------------|---------------------|-------------------|
| <i>Eco-RI</i> ACT x <i>Mse</i> CTC | 102 | 92 | 90.2% |
| <i>Eco-RI</i> AGG x <i>Mse</i> CAA | 101 | 93 | 92.1% |
| <i>Eco-RI</i> ACG x <i>Mse</i> CTC | 65 | 65 | 100% |

6.4.1. Análisis de diversidad genética de la colección de Pizano S.A

El análisis de cluster para los 33 individuos de la colección de Pizano S.A., se basó en 268 marcadores AFLP. Se evidenció la agrupación de los individuos en dos grupos Piz A y Piz B a una distancia entre estos de 0.4. De igual forma cada una de estas agrupaciones presenta sub grupos.

En el dendrograma con el índice de Dice, se observa que las sub agrupaciones del primer grupo (Piz A) se relacionan a un valor de distancia genética de 0.395. Piz A lo conforman

cuatro sub grupos Piz 1, Piz 2, Piz 3, Piz 4; en estos grupos se encuentran distancias genéticas entre 0.140 y 0.39.

El subgrupo Piz 1 presenta distancias entre 0.140 y 0.287, los clones P64, P62, P61, P68, P67, P66, P91, P86 conforman este grupo (Figura 5).

Las distancias genéticas entre 0.15 y 0.274 se encuentran en la agrupaciones de los clones de la sub agrupación Piz 2. Los clones con mayor relación son P55 y P54 a una distancia genética de 0.15, así mismo se encuentran en este grupo los clones P53, P51, P49, P48, P60, P56

Cabe destacar que las sub agrupaciones Piz 1 y Piz 2 se diferencian a 0.274. Si bien es cierto que el clon P78 no se encuentra dentro de ninguno de los dos subgrupos mencionados anteriormente, presenta una distancia genética de 0.326 respecto a estos dos grupos (Figura 5).

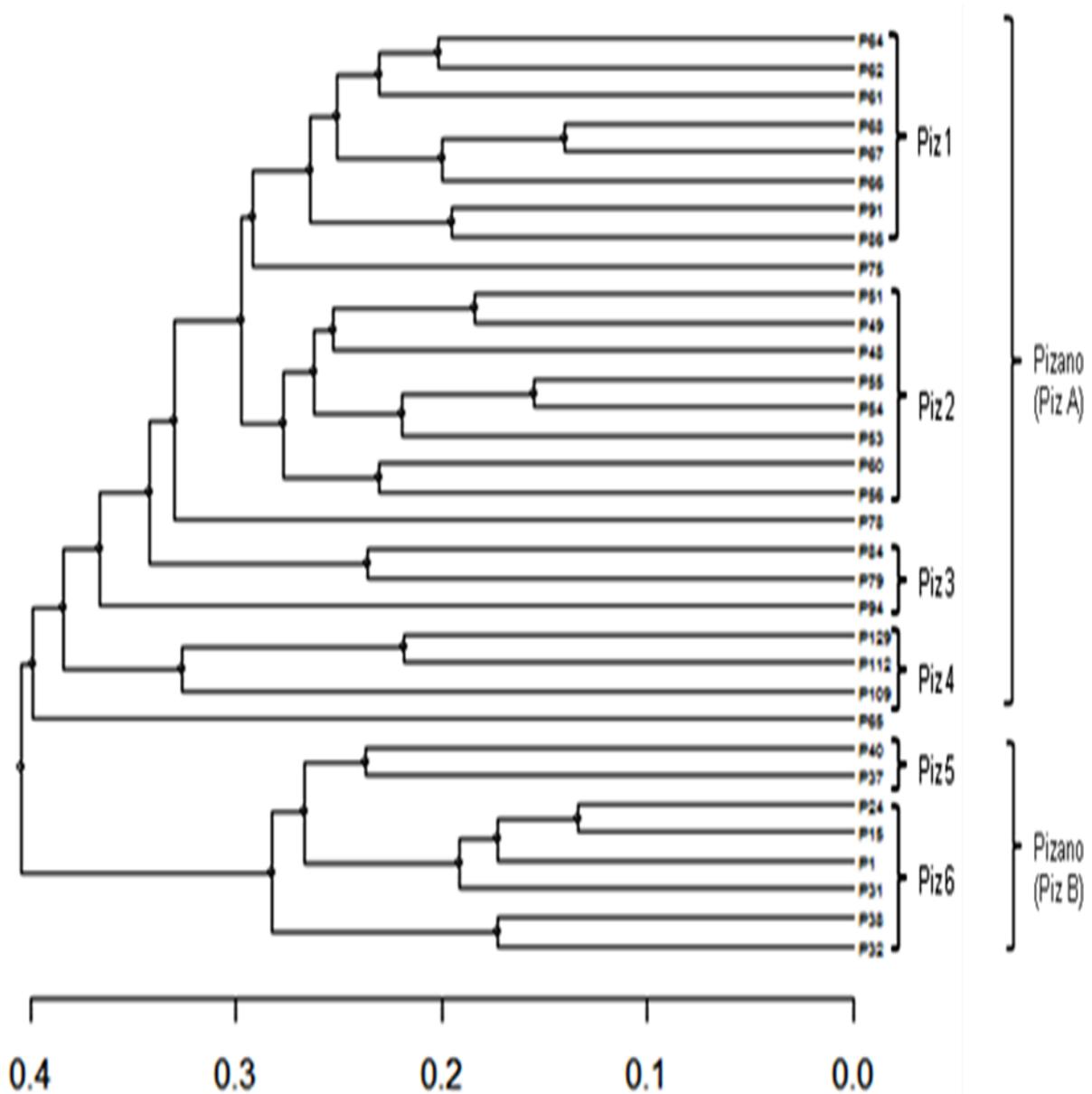


Figura 5. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genética mediante marcadores AFLP de 33 clones de *Gmelina arborea* colección Pizano S.A.

En la sub agrupación Piz 3 se encuentran los clones P84 y P79 relacionados a una distancia genética de 0.235, agrupándose estos con los subgrupos Piz 1 y Piz 2 a una distancia de 0.355, el clon P94 presenta una distancia genética de 0.37 respecto a los clones antes mencionados.

Por último en el grupo Piz A, se encuentra el subgrupo Piz 4 conformado por los clones P129, P112, P109 y P65.

En el grupo Piz B se agrupan los sub grupo Piz 5 y Piz 6; los clones P24, P15, P1, P31, P38 y P32 conforman Piz 5 (Figura 5). Por otra parte se encuentran los clones P37 y P40 relacionados a una distancia de 0.237 haciendo parte del subgrupo Piz 6.

6.4.2. Análisis de coordenadas principales colección Pizano S.A

Las tres primeras coordenadas explicaron el 69.58% de la variabilidad genética total existente en los clones, como se observa en la Tabla 7.

Tabla 7. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de *Gmelina arborea* de 33 clones de la colección Pizano S.A.

| Percentage of variation explained by the first 3 axes | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Axis | 1 | 2 | 3 |
| % | 36,89 | 19,11 | 13,58 |
| Cum % | 36,89 | 56,01 | 69,58 |

La primera coordenada explica el 36.89% de la variabilidad presente entre los clones, separando la colección en dos grupos, Pizano (Piz A) y Pizano (Piz B) (Figura 6).

La segunda coordenada explica el 19.11% de la variabilidad sub dividiendo cada grupo. Piz A está dividido en cuatro sub grupos Piz 1 que agrupa los clones P61,P62,P62,P64, P66,P67,P68,P86,P91; Piz 2 agrupando los clones P48,P49,P51,P53,P54,P55,P56,P60; Piz 3 conformado por los clones P79,P84,P94 y por ultimo Piz 4 con los clones P112,P109,P129 (Figura 6). El grupo Piz B lo conforman Piz 5 con los clones P1, P15, P24, P31, P32, P38; Piz 6 con los clones P37, P40 (Figura 6).

La tercera coordenada explica el 13.58% de la variabilidad total (tabla 7). Los resultados obtenidos en este análisis basado en las frecuencias de los marcadores AFLP, reflejan los resultados obtenidos en el análisis de cluster con el coeficiente de Dice.

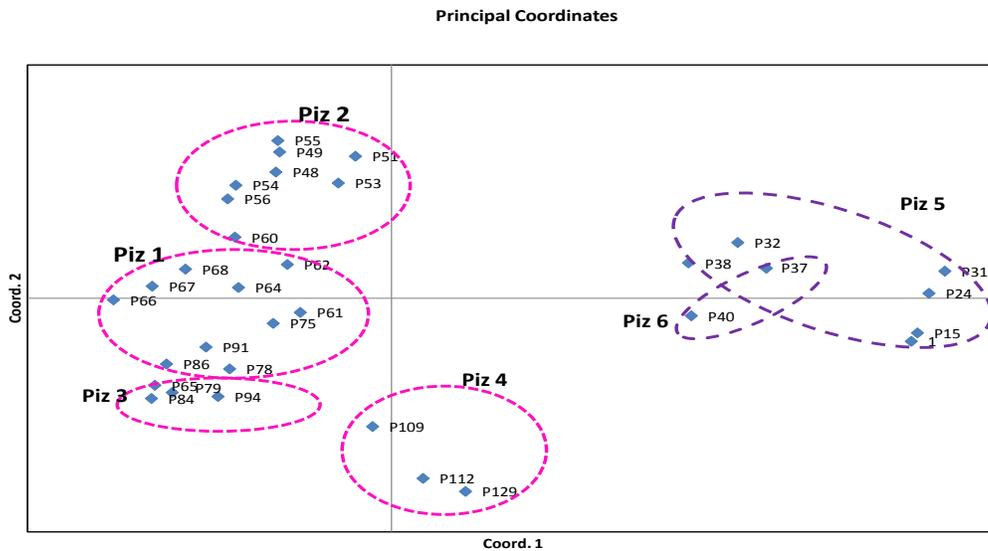


Figura 6. Análisis de coordenadas principales (PCA) 33 clones *Gmelina arborea* colección Pizano S.A

6.5. Análisis con marcadores AFLP Colección Camcore

La amplificación de DNA usando los marcadores AFLP para esta colección mostró un total de 228 bandas (loci), en 35 individuos de *Gmelina arborea* de la colección de Camcore (mantenidos en las plantaciones de Pizano) (Tabla 8). Las bandas presentaron tamaños entre 330 y 80 pares de bases (pb). El mayor número de loci (80) fue obtenido con la combinación de “primers” *Eco-RI* ACT X *Mse* CTC, el menor número de bandas (73) se evidenció con la combinación *Eco-RI* ACG X *Mse* CTC. La combinación *Eco-RI* AGG X *Mse* CAA presentó el 97.33%, las otras combinaciones presentaron el 86.30 y

81.25 % de polimorfismo respectivamente. Se evidenció un total de 96.92% de polimorfismo con 221 loci

Tabla 8. Numero de bandas y polimorfismo observado en el análisis de DNA de *Gmelina arborea* colección de Camcore con marcadores AFLP.

| Combinación de “primers” | Numero de bandas | bandas polimórficas | Porcentaje de polimorfismo |
|---|-------------------------|----------------------------|-----------------------------------|
| <i>Eco-RI</i> ACT x <i>Mse</i> CTC | 80 | 65 | 81.25% |
| <i>Eco-RI</i> AGG x <i>Mse</i> CAA | 75 | 73 | 97.33% |
| <i>Eco-RI</i> ACG x <i>Mse</i> CTC | 73 | 63 | 86.30% |

6.5.1. Análisis de diversidad genética de la colección de Camcore

El análisis de cluster para los 35 individuos de la colección de Camcore, los cuales provienen de Myanmar (Kintha, Kyuntaw, Ladagyi, Sin thaut, Thin Ka Don, Waibon) y Tailandia (Pak Chang, Pong Nam Ron, Saiyoke), está basado en 228 marcadores AFLP.

En general se puede decir que se observa una agrupación definida según la procedencia del material evaluado, evidenciándose la agrupación de los individuos en dos grupos Cam A y Cam B con una distancia genética de 0.385; El grupo Cam A agrupa clones procedentes de Myanmar.

En el dendrograma con el índice de Dice, se observa dentro del grupo Cam A dos subgrupos, Cam 1 y Cam 2, a una distancia genética de 0.358 (Figura 7).

El subgrupo Cam 1 agrupa a los clones C43 (Waibon), C41 (Wyuntaw) C45 (Ladagyi), C49 (Waibon), C48 (Waibon), C46 (Kintha), todo estos con una similitud del 62.5% (Figura 7).

Los clones C35 (Waibon), C33 (Kintha), C34 (Waibon), C29 (Kyuntaw), C39 (SCC Bullk), C36 (Waibon) conforman el subgrupo Cam 2 (Figura 7).

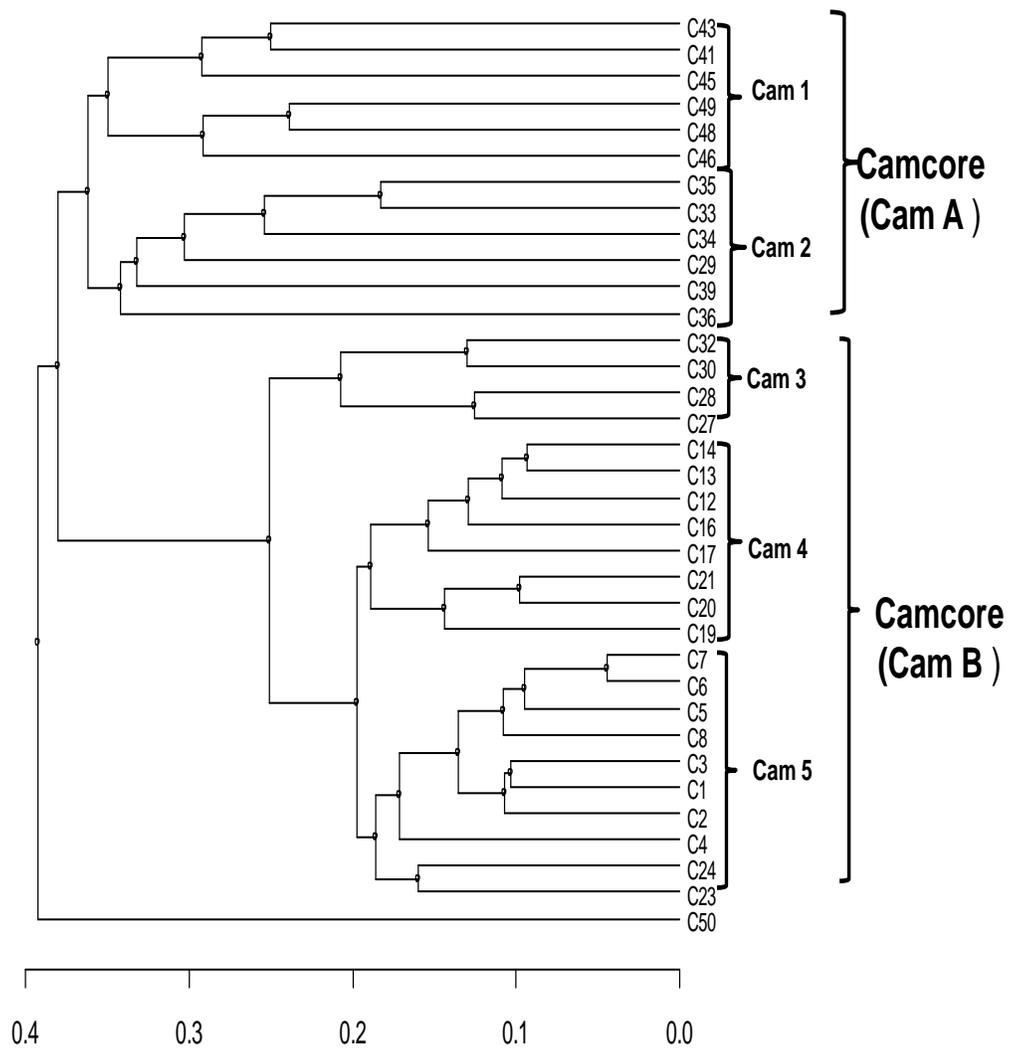


Figura 7. Dendrograma usando el algoritmo UPGMA, basado en el índice de similitud de Dice. Muestra las distancias genética mediante marcadores AFLP de 35 clones de *Gmelina arborea* colección Camcore.

Los clones pertenecientes al grupo Cam B presentan una similitud del 75%; en este se observaron valores de distancia genética más pequeños (0.048), comparados con el grupo anteriormente descrito; de igual manera se observan sub agrupaciones dentro de este Cam 3, Cam4, Cam 5, que se agrupan entre sí a una distancia genética de 0.249. En donde Cam 4 y Cam 5 agrupan clones procedentes de Tailandia (Figura 7).

En Cam 3 se encuentran los clones C32 (Waibon), C30 (Kyuntaw), C28 (Kyuntaw) y C27 (Kintha). Agrupados a una distancia genética de 0.201; en este grupo se mantiene la asociación geográfica.

Cam 4 asocia los clones C14 (Sin Thaut), C13 (Sin Thaut) y C12 (Sin Thaut), estos pertenecientes a poblaciones naturales de Myanmar según los reportes de Hodge and Dvorak (2004). A una distancia genética de 0.186 se agrupan los clones C16 (Saiyoke), C17 (Pak Chong) y C21 (Pong Nam Ron), C20 (Saiyoke) y C19 (Saiyoke) de Tailandia manteniéndose la agrupación según su distribución geográfica (Figura 7). Los clones C17 y C21 pertenecen a poblaciones naturales.

Cam 5 agrupa los clones C7 (Sin Thaut), C6 (Thin Ka Don), C5 (Sin Thaut), C8 (Sin Thaut), C3 (Sin Thaut), C1 (Sin Thaut), C2 (Thin Ka Don) y C4 (Sin Thaut) a una distancia genética de 0.174, es importante destacar que estos clones pertenecen a poblaciones naturales de Myanmar; dentro de este grupo también se encuentran los clones C24(Saiyoke) y C23 (Pong Nam Ron) de Tailandia, este último de una población natural, con una similitud del 82%.

Es importante anotar que el clon C50 (Monterey Orchard) proviene de un huerto semillero de segunda generación, utilizado como control en las pruebas de progenie; este se agrupa al subgrupo Cam 5 a un distancia genética de 0.376

Las muestras provenientes de la colección de Camcore muestran claramente la asociación de los clones según su distribución geográfica, diferenciándose los clones de poblaciones naturales y los clones de plantaciones.

En la colección de Camcore se observan distancias genéticas más pequeñas en comparación a la colección de Pisano S.A, permitiendo sugerir que existe mayor similitud entre los clones de Camcore, lo que puede estar reflejando una estrecha base genética de esta colección; contrario a lo que sucede en la colección de Pisano S.A. que presenta valores de distancia genética mayores entre los clones.

6.5.2. Análisis de coordenadas principales colección Camcore

Para la colección de Camcore las tres primeras coordenadas explicaron el 71.42% de la variabilidad genética total existente en los clones (Tabla 9).

Tabla 9. Análisis en porcentaje de coordenadas principales de *Gmelina arborea* (35 clones) colección Camcore

| Percentage of variation explained by the first 3 axes | | | |
|---|-------|-------|-------|
| Axis | 1 | 2 | 3 |
| % | 43,71 | 14,65 | 13,05 |
| Cum % | 43,71 | 58,37 | 71,42 |

La primera coordenada explicó el 43.71% de la variabilidad presente entre los clones, separando la colección en dos grupos, (Cam A) y (Cam B) Figura 8.

La segunda coordenada explicó el 14.65% de la variabilidad, sub dividiendo cada uno de los grupos anteriormente conformados, Cam A se dividió en tres sub grupos, Cam 1 con los clones C41, C43, C45, C46, C48 y C49;

Cam 2 agrupando los clones: C29, C33, C34, C35, C36, C39. El subgrupo CAM 3 lo conforman los clones: C27, C28, C30 y C32 (Figura 8).

Por otra parte Cam B conformado por dos subgrupos; Cam 4 agrupando los clones C12, C13, C14, C16, C17, C19, C20 y C21; Cam 5 con los clones, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C23 y C24 (Figura 8).

Cabe destacar que la coordenada 2 no permite evidenciar la separación de los grupos Cam 4 y Cam 5; al analizar la tercera coordenada que explica el 13.05% de la variabilidad total (Tabla 9) se pudo establecer las diferencias entre los dos grupos Cam 4 y Cam 5.

Los resultados obtenidos en este análisis basado en las frecuencias de los marcadores AFLP, concuerdan con los resultados obtenidos en el análisis de cluster con el coeficiente de Dice.

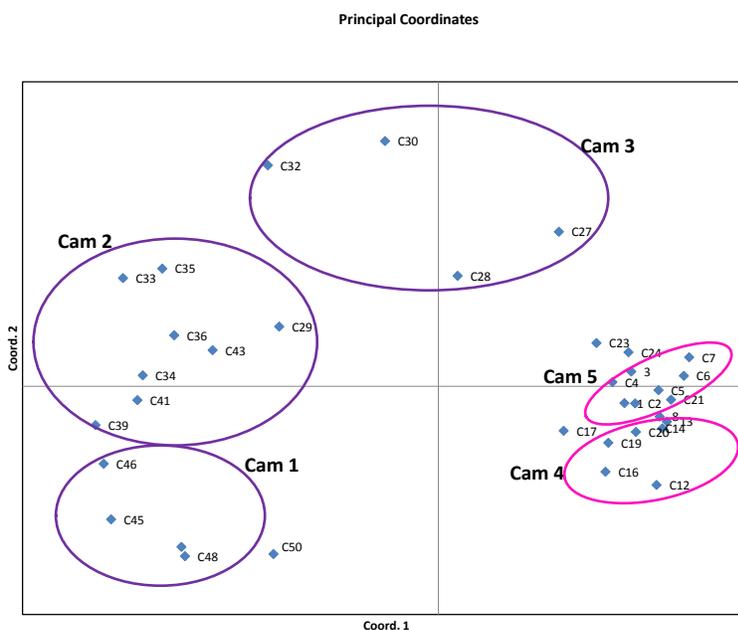


Figura 8. Análisis de coordenadas principales (PCA) de 35 clones *Gmelina arborea* colección Camcore

La baja diversidad encontrada en la colección de Camcore con respecto a la de Pizano S.A, está relacionada con el proceso de selección, ésta es quizás la fuerza más importante para determinar la frecuencia de ciertos componentes génicos, ya que hace la discriminación en pro o en contra de ciertas características fenotípicas. Las fuerzas selectivas las ejercen la demanda de productos forestales, las prácticas y experimentaciones silvícolas, la aplicación de los métodos de mejoramiento forestal y en forma mucho más drástica, los cambios en la utilización de la tierra (Luoma-ah *et al.* 2003).

Los resultados obtenidos sugieren que las dos colecciones pertenecen a acervos genéticos diferentes (Figura 3), lo cual puede ser explicado por los diversos orígenes de los parentales o de los árboles Plus (Murillo *et al.* 2003); que para el caso de la colección de Pizano, se conoce que éstos fueron plantados en el año 1997 en Zambrano (Bolívar), a partir de semillas que fueron colectadas de árboles que se encontraban en diferentes regiones de la costa atlántica y de otros países como India, Costa Rica y Chile. Para el caso de la colección de Camcore, la procedencia de la semilla, a partir de la cual fueron seleccionados los árboles plus, es conocida (Anexo 1).

Naik *et al.*, (2009) en su trabajo con marcadores ISSR (Inter-simple sequence repeat maker), en ocho poblaciones de *Gmelina arborea* (poblaciones naturales, poblaciones de bosque fragmentado y plantaciones), procedentes de la India y Malaysia, encontraron una distancia genética entre las poblaciones analizadas de 0.43, sin embargo al interior de cada una de las poblaciones se evidenció una distancia genética de 0.24; teniendo en cuenta que el presente estudio se realizó con marcadores AFLP, contrario a los resultados de Naik *et al.*(2009) la distancia genética encontrada entre la colecciones analizadas fue de 0.7 y dentro de cada una de las colecciones de 0.4. Las diferencias encontradas respecto a la distancia genética en cada uno de los estudios pueden ser explicadas por la amplia distribución de la especie en diferentes zonas eco-climáticas sugiriendo una amplia base genética, resultado de la adaptación de las plantas a las diferentes condiciones ambientales.

El nivel de diferenciación, de cada una de las colecciones analizadas en los dos estudios, sugiere el aislamiento genético entre estas, lo cual puede interpretarse como un bajo flujo genético, permitiendo de esta manera una alta correlación entre las distancias geográficas y genéticas (Naik *et al* 2009).

Cabe mencionar que la similitud encontrada entre y dentro de las colecciones analizadas por Naik *et al.* (2009), donde se tuvieron en cuenta poblaciones naturales, poblaciones de bosque fragmentado y plantaciones de bancos de germoplasma, es diferente a la encontrada en el presente estudio, con marcadores AFLP, donde solo se tomaron en cuenta plantaciones de *Gmelina arborea*. Aunque las colecciones evaluadas pueden pertenecer a diferentes procedencias, éstas podrían estar sometidas a una selección semejante por parte de los productores, quienes seleccionan los mejores genotipos según los caracteres fenotípicos presentados en campo y su potencial en el mercado mundial.

Ciertamente, la eliminación de genotipos, ya sea dirigida o no, tendrá repercusiones positivas o negativas en los recursos génicos forestales, desde el punto de vista económico si no se lleva a cabo un plan de manejo silvicultural adecuado.

En poblaciones naturales la diversidad genética puede verse afectada directamente por las características reproductivas de las especies evaluadas; por ejemplo la reproducción vegetativa reduce el flujo de genes dentro de las poblaciones; de igual manera factores como la edad y el nivel de perturbación pueden estar influenciando la diversidad clonal de las especies (Tsyusko *et al.*2005)

Diferentes comportamientos en cuanto a diversidad genética se han reportado para otras especies reproducidas clonalmente, aun cuando estos estudios se han realizado utilizando diferentes técnicas moleculares al igual que diferentes índices de diversidad; como es el caso de los estudios realizados por Albert *et al.* (2003) en *Vaccinium myrtillus L.*, utilizando marcadores moleculares RADP y AFLP donde se encontró una diversidad genética de $D=0.94$. Los resultados permitieron concluir que la diversidad genética dentro de las colecciones es mayor respecto a la diversidad entre cada una de ellas.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos se pueden sugerir los clones a ser cruzados en etapas sucesivas dentro del plan de mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares de *Gmelina arborea* en cada una de las colecciones y entre colecciones. En general se plantea cruzar aquellos individuos con mayor distancia genética, permitiendo de esta manera obtener una mayor ganancia a nivel genético.

Desde este punto de vista, los primeros cruces sugeridos para las colecciones analizadas serian clones del subgrupo Cam 5, por ser clones provenientes de poblaciones naturales, con clones del subgrupo Piz 2; otro posible cruce seria clones del grupo Cam 4 con clones del grupo Piz 1, así como los clones del subgrupo Cam 2 y clones del grupo Piz 5.

En la colección de Pizano S.A, se sugieren los cruces de los clones del subgrupo Piz 2 con Piz 5, Piz 1 con Piz 4 y Piz 3 con Piz 5.

Para la colección de Camcore los cruces sugeridos son: los clones de subgrupo Cam 1 y Cam 5, clones del grupo Cam 2 con clones del grupo Cam 4 y finalmente clones del grupo Cam 3 con clones del grupo Cam 5.

Cabe anotar que los cruces anteriormente mencionados tienen fundamento en las distancias genéticas obtenidas mediante los marcadores AFLP, sin embargo no dejan de ser muy generales, por lo que se hace necesario conocer más del comportamiento de los caracteres fenotípicos presentados por estos clones en campo, para que de esta manera los cruces estén de acuerdo con las necesidades del productor y así poder llevar a cabo una selección más precisa de los clones a cruzar.

6.6. Perfiles genéticos o huella genética

El uso de la silvicultura clonal requiere como primera instancia de la caracterización adecuada de los genotipos existentes; los marcadores moleculares se convierten en una herramienta práctica para llevar a cabo la distinguibilidad de los genotipos, pues permiten el cálculo de distancias entre estos, generan perfiles de bandas que son traducidos en identificadores de genotipos y son susceptibles a la automatización.

De igual manera los marcadores moleculares reconocen directamente las diferencias genéticas entre individuos o clones, obteniendo un perfil molecular o “*finger-printing*” característico a cada variedad e independientemente de las condiciones de crecimiento de las plantas (Narváez *et al.* 2000). Además permiten obtener mejores estimaciones de la diversidad genética de una población determinada en un periodo de tiempo menor en comparación con estrategias convencionales.

La identificación o certificación de un clon refleja las características únicas de cada individuo. Brick & Sivolap (2003) plantearon que un genotipo certificado es aquel en que la fórmula del estado alélico o arreglo del *loci* refleja la especificidad del genotipo dado, permitiendo de esta manera la identificación y diferenciación de los demás.

En los anexos 6 y 7 se muestran los perfiles genéticos para cada uno de los clones en las dos colecciones; dejando en evidencia que ninguno de los clones de las colecciones evaluadas presenta un perfil igual al otro. Como ejemplo de esto se puede reportar los clones C6 y C7 los cuales se agrupan a una distancia genética de 0.048 lo que los hace muy similares entre sí, al mirar su perfil genético o huella genética se observa que estos

se diferencian en nueve *loci*; entre los clones C41 y C43 existe una diferencia de 19 *loci* en su perfil genético, teniendo estos una distancia genética de 0.248.

Para la colección de Pizano S.A. clones como P67 y P68 que presentan el 86% de similitud genética, se diferencian en su perfil genético en 21 *loci*; de esta manera se comprueba nuevamente que ninguno de los clones evaluados se parece entre sí un 100%.

Conociendo el perfil genético de cada uno de los clones, es posible controlar su estabilidad y pureza en sucesivas etapas de multiplicación. Es oportuno mencionar que la silvicultura clonal, depende directamente de los recursos genéticos que generen en forma permanente nuevos clones, dando sustento a este tipo de producción. Por lo tanto se requiere un programa operacional clonal y un programa de mejoramiento genético. Además, una correcta utilización operacional de los clones en el tiempo (por ejemplo variar los años de plantación de un mismo clon) y el espacio físico (ejemplo plantaciones de bloques monoclonales de superficies acotadas), contribuirán a sustentar mejor este sistema de producción.

Los resultados presentados en este estudio se pueden asumir como un primer paso en la evaluación de la diversidad genética, de las colecciones que mantiene la empresa Pizano S.A, para hacer la selección adecuada del germoplasma de las plantaciones a ser utilizado en estrategias de conservación y manejo silvicultural.

De esta manera se plantea que los marcadores AFLP son un marcador confiable para estimar la diversidad genética en plantas clonales, así como para la detección de genotipos únicos.

7. CONCLUSIONES

- Se propone el uso de la técnica de marcadores moleculares AFLP como una alternativa práctica, rápida y efectiva para el estudio de la diversidad genética dentro de las poblaciones de *Gmelina arborea*
- Las dos colecciones de *Gmelina arborea* evaluadas presentan una diversidad genética al interior de cada una de 0.4, dejando en evidencia la necesidad de ampliar la base genética de la especie, teniendo en cuenta las necesidades de los productores y las características fenotípicas de los clones.
- Teniendo en cuenta las relaciones entre los clones, se pueden diseñar sub grupos de apareamiento para próximas etapas de planes de mejoramiento.
- Con los marcadores AFLP se logró obtener una huella genética para cada uno de los clones evaluados, esta herramienta es reproducible y suficientemente robusta para ser utilizada en un proceso de certificación forestal clonal.

8. RECOMENDACIONES

- Se propone el uso de la técnica de marcadores moleculares Microsatélites como una alternativa practica, rápida y efectiva para el estudio de la diversidad genética en *Gmelina arborea*.
- Completar la investigación evaluando material vegetal de los diferentes materiales de *Gmelina arborea* presentes en Colombia, haciendo uso de los marcadores moleculares AFLP y Microsatélites, para corroborar los resultados obtenidos en el presente estudio
- Tener en cuenta los datos morfológicos de los clones y compararlos con los resultados obtenidos en el análisis de diversidad para realizar los cruces en sucesivas etapas del plan de mejoramiento genético.
- Realizar la asociación de los marcadores moleculares con características morfológicas.

9. BIBLIOGRAFÍA

Ahuja M. 1993. Biotechnology and clonal forestry. *In* Ahuja M y Libby W eds. Clonal Forestry I: genetics and biotechnology. Institute of Forest Genetics. Germany. 135-144.

Ajmone Marsan, P; Gorni, C; Chitto, A; Redaelli, R; Van Vijk, R; Stam, P; Motto, M. 2001. Identification of Qtl's 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.

Albert, T., Raspe, O., Jacquemart, A. 2003. Clonal structure in *Vaccinium myrtillus* L. revealed by RAPD and AFLP markers. *Int. J. Plant Sci.* 164 (4) 649-655.

Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., Rocha, O. 2005. Relaciones genéticas en una colección de clones de *Gmelina arborea* (Roxb) reveladas con marcadores AFLP. Kurú. *Revista forestal. Costa rica.* 2(6) pp 14.

Balcorta, H.C., Varjas, J.J. 2004. Variación fenob.típica y selección de árboles en una plantación de melina (*Gmelina arborea* Linn., Rox) de tres años de edad. *Revista chapingo. Serie ciencias forestales y ambientales (Mexico).* 10 (001): 13-19.

Barrantes, G. 1999. Comercialización de semillas en el Banco del Centro Agrícola Cantonal de Hojanca (CACH). En segundo simposio sobre Avances en la producción de semillas Forestales en América Latina. Santo Domingo. p 243- 248

Becerra, V., Paredes, M. 2009. Uso de marcadores moleculares en la certificación genética forestal. *INTATierra Adelanto.* 36-37.

Bered, F. 1998. extrção de DNA- considerações e prática. In: Milach, S. Marcadares moleculares em plantas. Porto alegre, 1998, Pp141.

Bleas, M.J, De grandis, S.A, Lee, H., Trevors, J.T. 1998. Amplified fragment length polymorphism (AFLP): A review of the procedure and its applications. *Journal Microbiology & biotechnology.* 46: 99-114.

Boiteux, L.S; Fonseca, M.E.N; Simon, P.W. 1999. Effects of plant tissue and Ana purification method on randomly amplified polymorphic DNA- based genetic fingerprinting analysis in crrot. J. Amer. Soc. Hort.Sci. 124 (1): 32-38

Brick, A.F., Silvolap, YU.M. 2001. Molecula genetic identification and certification of soybean (*Glycine maxL.*) Cultivars.Russian Journal of Genetics. vol 37(9) 1061-1067

Bustamante, S.L, Guzman, B.M., Buitrago, H.G. 2001 Caracterización molecular de algunas especies y variedades de ñame presentes en la costa Atlántica colombiana. Revista Colombiana de biotecnología 3 (2): 38-43.

Butcher, P.A., Glaubitz, J.C., Moran, G.F. 1999. Aplicaciones de los marcadores microsateélites en la domesticación de árboles forestales. Recursos genéticos forestales 27- FAO

Cadena, M.E., Guauque, G.A. 2009. Respuesta a la fertilización N:P:K en plantación de *Gmelina arborea*. Bosque Seco Tropical (Bajo Magdalena –Colombia). XIII World Forestry Congress. Buenos Aires. Argentina.

Caetano- Anollés, G Trigiano R.N 1997. A versatile and universal tool for genome analysis. Plant Molecular Biology 25: 1011-1026.

Carpineti, L. 2005. Importancia de la Silvicultura Clonal. IDIA XXI Forestales. Año V - N° 8:153-156.

Carrer, R. Lohmann, L. 2006. El papel del sur. Plantaciones forestales en la estrategia papelera internacional [en línea] <http://www.olca.cl/oca/brasil/celulosa01.htm> [Consultado Marzo 2010]

Carson, M.J., Carson, S.D., Richardson, T.E., Walter,C., Wilcox P.L., Burdon R.D., Gardener 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, Autralia.

Carvalho, L.C., Goulao, L.,Oliveira, C., Goncalves, J.C., Amancio, S. 2004.RAPD assessment for identification of clonal identity and gentic stability of *in vitro* propagated chestnut hybrids. Plant cell, tissue and Organ Culture. 77: 23-27.

Chen, X.L., Lim, S.H., Wong, S.M., Lee, Y.H., Yam, Y.H., LIN J.J., 1999. Amplified fragment length polymorphism analysis of vandaceous orchids. *Plant Sci (Limerick)* 141:183-189.

Cordoba, S. 2009. Invierta en Colombia, trabajo, compromiso, ingenio. *Sector Forestal* 1(1): 1-26.

Chaves A. L., Vergara C.E, 1995. Dichloromethane as an economic alternative to chloroform in the extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Reporter*. 13(1): 18-5.

Crisci. J.V. y López M.F.1983.Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Secretaria General de la Organización de los estados Americanos. Programa Regional del desarrollo Científico y tecnológico. Monografía No.26.Washington D.C. pp 132

Dahlberg, J.A., Zhang, X.,Hart , G.E., Mullet, J.E. 2002. Comparative Assesment of Variation among Sorghum Germplasm Accessions using Seed Morphology and RAPD Measurements. *Crop Science* 42: 291- 296.

Dhakulkar, S., Ganapathi, T.R., Bapat, V.A. 2005. Induction of Hairy Roots in *Gmelina arborea* Roxb. Using *Agrobacterium rhizogenes*. *Founder's day Special issue*.100-106.

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

Decroocq, S., Butcher, P.A. and Moran, G.F. 1997 Genetic diversity and conservation of microsatellite loci in acacias. Poster presented at *Plant and Animal Genome V Conference*, San Diego, California, Jan. 12-17

Douhovnikoff, V., Dodd, R.S. 2003. Intra-clonal variation and a similarity threshold for identification of clones: application to *Salix exigua* usig AFLP molecular markers. *Theoretical and Applied Genetics*. 106: 1307-1315.

Doyle, JJ., Doyle, J.L. 1991.Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 1: 13-15

Dvorak, W.S. 2004. World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges. *New Forest*. 28: 111-126

Echenique, V. Rubinstein, C, Mroginski, L. 2004. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Parte VII, capítulo 2. Ediciones INTA pp 232

Espinoza, J. A. 2003. Genetic Variation in Wood Density of *Gmelina arborea* planted on different sites in Western Venezuela. Tesis (Máster of science). Universidad Estatal de Carolina del Norte. Departamento Forestal. Raleigh. USA. 66p.

Engelborghs, I., Swennen, R., Campenhout, S.; Van-campenhout, S. 1998. The potential of AFLP to detect genetic differences and somaclonal variants in *Musa* spp. *Infomusa*. 7 (2): 3-6

Greaves, A. 1981. *Gmelina arborea*. *Forestry abstracts* 42 (6): 238 – 251

Goto, S., Ieiril, R. & Miyahara, F. 1999. RAPD analysis of cutting cultivars and plus tree clones of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) in Fukuoka Prefecture. *Journal of Japanese Forest Society* 81: 187–193.

Gonzalez D.O., Palacios N., Gallego G., Tohme J., 1995. Protocolos para Marcadores Moleculares. Centro internacional DeAgricultura Tropical CIAT, Cali, Colombia Pp 75

Goto, S., Thakur, R.C. and Ishii, K. 1998. Determination of genetic stability in long-term micropropagated shoots of *Pinus thunbergii* Parl. using RAPD markers. *Plant Cell Reports*. 18 (3-4): 193-197.

Gupta, P.K. & Rao, J.K. 2002. Molecular Markers in crop improvement: Present status and future needs in India. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 70: 229-234.

Gutierrez, C.B., Chung, P. 1994. Propagación vegetativa y silvicultura clonal en Eucalipto. *Ciencia e Investigación (Chile)* 8 (1) 139-175.

Haines, R.J. 1994. La biotecnología en el mejoramiento de especies forestales : tendencias y prioridades de la investigación. *Unasyva* 45: 46-52.

Hills, D.M; Mortiz, C. 1990. Molecular Systematics. Sinauer Associates, INC Publishers. USA. Pp 45

Hodge, G.R., Dvorak, W.S. 2004. The CAMCORE international provenance/ progeny trials of *Gmelina arborea*: genetic parameters and potential gain. New Forest. 28: 147- 166.

Invitrogen. 2003. AFLP® Análisis System II AFLP® Small Genome Primer Kit. Instruction Manual. Invitrogen life Technologies Pp 25.

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

Jara, L.F. 1995. Mejoramiento Forestal y Conservación de recursos Genéticos Forestales. Tomo II. CATIE. Costa Rica. pp356.

Karp, A. Edwards, K. 1997. DNA markers; a global overview. Wiley-VCH. Pp 1-13

Karp, A. 2000. Molecular tools for detecting genetic diversity. Acta. Hort. 530: 17-29.

Kijkar, Somyos. Tropical Tree Seed Manual [En línea]. The KNGR team. Enero 1 2003. < <http://www.rngr.net/Publications/ttsm/Folder.2003-07-11.4726/PDF.2004-03-03.1531/file>> [Consulta 15 Febrero de 2009].

Keil, M., & Griffin, A.R. 1994. Use of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers in the discrimination and verification of genotypes in *Eucalyptus*. TAG Theoretical and applied Genetics. 89 (4): 442-450.

Kumar, A., Matharoo, A.K. 2003. Genetic improvement of *Gmelina arborea* in India. In recent advances whit *Gmelina arborea*. North Carolina State University. Raleigh, NC.US.CAmcore. 117: 59-61.

Lasso, E. 2008. Technical advances. The importance of setting the right genetic distance threshold for identification of clones using amplified fragment length polymorphism: a case

study with five species in the tropical plant genus *Piper*. *Molecular Ecology Resources*.8: 74-82.

Leakey, R.R.B., Mesen. F. 1994. Estrategias de silvicultura clonal para especies forestales tropicales En: Mejoramiento genético forestal con referencia Especial a América Central. capitulo 11.170-186.

Leakey, R.R.B., Mesen. F., Tchoundjeu, Z., Logman, K.A., Dick, J.M., Newton, A., Martin, A., Grace, J., Munro, R.C., Mutoka, P. N., 1990. Low- technology techniques for the vegetative propagation of tropical trees. *Commonwealth Forestry Review (Inlaterra)* 69 (3): 247-257.

López, J.A. 2004. Jornada técnica de campo forestal argentina s.a. predio buena vista II.INTA - EEA Bella Vista. Ctes.

Luoma-ah, T; Homg, L.T; Ramanath Relo, V. & Sim, H.C. 2003. *Forest Genetic Resources Conservation and management*. FAO:IPGRI. pp356.

Mariño, Y.A. 2006. Evaluación del punto de marchitez permanente bajo condiciones de invernadero como variable para la asignación de clones de *Gmelina arborea* (roxb) a sitios potenciales de plantación. Tesis de pregrado.

Martin, M.A., Harrona. L. 2001. El mejoramiento genetico forestal y su aporte al desarrollo del sector forestal. *SaGpya Foretal* 19.

Moritz, C., 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas*. 130: 217-228.

Malabadi, R.B., Hills P.N. and van Staden, J. 2006. RAPD assessment of clonal identity of somatic seedlings derived from vegetative shoot apices of mature *Pinus patula* trees. *South African Journal Botany*. 72: 181-183.

Molinari, H. B, Crochemore,M.L, 2001. Extração de DNA genômico de *Passiflora spp*. Para análises PCR-RAPD. Pp 113- 124.

Motta, M. 1996. Latifoliadas zona baja. Guía técnica # 2 Servicio de información y Documentación Seidal – Conif. Bogotá. 103 p.

Moya, R. 2004. Effect of management treatment and growing regions on Wood properties of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New Forest*. 28: 325-330.

Mueller, U., Wolfenbarger, L. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting, *Reviews. Tree*. 14. (10): 389-394.

Murillo, O. Rojas, J.L. Badilla, y. 2003. Reforestación Clonal. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Segunda Edición. Cartago. Costa Rica.

Motta, M. 1996. Latifoliadas zona baja. Guía técnica # 2 Servicio de información y Documentación Seidal – Conif. Bogotá. 103 p.

Naik, D., Singh, D., Vartak, V., Paranjpe, S., Bhargava, S. 2009. Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Roxb. *New Forests*, 39: 99-115.

Narayanan, C., Wali, S.A., Shukla, N., Kumar, R., Mandal, A.K., Ansari, A. 2007. RAPd and ISSR Markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*). *Journal of tropical forest science* 19 (4): 218-225.

Narváez, R, Valenzuela, B; Muñoz, C y Hinrichsen, P. 2000. Comparación RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de Vid basados en el estudio de de fragmentos genómicos anónimos. *Agricultura Técnica (Chile)*.60:320-340.

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.

Oliveira, S.C., Amato, F., Barbosa, F., Corre[^]a, R.X., Moreira, A., Grattapaglia, D., Pereira, R., Brondani, V. 2007. Microsatellite markers for *Caesalpinia echinata* Lam.(Brazilwood), a tree that named a country. *Conserv Genet* 8: 1269–1271

Padua, F.M. 2004. Juvenile selection of *Gmelina arborea* clones in the Philippines. *New Forest*. 28: 195-200.

Park, Y.S., Barrett, J.D., Bonga, J.M., 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control, and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 34: 231-239.

Peakall, R. Smouse, P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6: 288-295.

Raina, S.N., Rani, V., Kojima, T., Ogihara, Y., Singh, K.P. and. Devarumath, R.M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. *Genome* 44: 763-772.

Rocha, P. 2003. Marcadores moleculares, una herramienta útil para la selección genética de palma de aceite. *Palmas*. 24 (2): 11-25

Rodriguez, F., Arias, D., Moya, R., Meza, A., Murrillo, O., Arguedas, M. 2004. manual para productores de melina *Gmelina arborea* en Costa Rica.

Romero, J . L. 2004. A review of propagation programs for *Gmelina arborea*. *New Forest*. 28: 245 – 254.

Scheepers, D., Eloy, M.C. and Briquet, M.1997. Use of RAPD patterns for clone verification and instudying provenance relationships in Norway spruce (*Picea abies*). *Theor.Appl. Genet*. 94: 480–485.

Segura, S., Coppens, G., Bohorquez, A., Ollintrault, P.,Tohme J. 2002. An AFLP diversity studyof the genus *Passiflora* focusing on subgenus Tacsonia. *Genetic Resources and Crop Evolution* Pp 1-13

Staub, J. E., Box, J., Meglic, V., Horejsi, T.F., mcCreight, J.D. 1997. Comparison of isozyme and random amplified polymorphic DNA data for determining intraspecific variation in *Cucumis*. *Genet. Res. Crop Evol.* 44: 257-269

Stefenon, V.M., Nodari, R.O., Sedrez, .M. 2004. AFLP protocol standardization and its informative capacity to genetic diversity analysis in *Araucaria angustifolia*. *Scientia forestalis* 64: 163-171.

Stuber, C.W., Polacco, M. Senior, M.L. 1999. Synergy of empirical Breeding, marker-Assisted Selection, and Genomics to Increase Crop Yield Potential. *Crop Sci.* 1571- 1583.

Takata, K. & Shiraishi, S. 1996. Discrimination of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) cutting cultivars in Kyushu region with RAPD markers. *Bulletin of Kyushu University of Forestry* 75: 1-14.

Tripiana, V., Bourgeols, M., Verhaegean, D., Vigneron, P., Bouvet.,J. 2007. Combining microsatellites, growth, and adaptive traits for managing in situ genetic resources of *Eucalyptus urophylla*. *Canadian Journal of Forest Research.* 37 (4): 773-785.

Tsyusko, O., Smith, M., Sharitz, R., Glenn, T. 2005. Genetic and clonal diversity of two cattail species, *Typha latifolia* and *T. angustifolia* (Typhaceae), from Ukraine. *American Journal of Botany.* 92 (7): 1161-1169.

Thompson, J.A., Nelson, R.L., Vodkin, L.O. 1998. Identification of diverse soybean germplasm using RAPD markers. *Crop Science* 38 Pp 1348-1355.

Valbuena, M., Gonzáles, S.S., Gil, L. 2008. Coppice forests and genetic diversity: A case study in *Quercus pyrenaica* willd from central Spain. *Forest Ecology and management* 254: 225-232.

Valverde, L., Alvarado, L., Hine, A. 2004. Micropropagation of clones from controlled crosses of *Gmelina arborea* in Costa Rica. *New Forest* 28:187-194.

Van de Ven, W. T. G., McNicol, R.J. 1995. The use of RAPD markers for the identification of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) clones. *Heredity* 75: 126-132.

Vasquez, W.& L. A. Ugalde. 1996. Rendimiento y calidad de sitio para *Gmelina arborea*, *Tectona grandis*, *Bombacopsis quinatum* y *Pinus caribaea* en Guanacaste, Costa Rica. Págs 7 – 13. en : Bertsch, F., W. Badilla. & E. Bornemisza. (eds). Puede la agricultura sostenible ser competitiva. Asociación Costarricense de la Ciencia del Suelo. San José. Costa Rica.

Vendrame, W.A., Cochert, G., Wetzstein, H.Y.,1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Rep* 18: 853-857.

Vos, P. Hogers, R. Bleeker, M. Reijans, M. Van de Lee, T. Hornes, M. Frijters, A. Pot, J. Peleman, J. Kuiper, M and Zabeau, M, 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407-4414.

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.

Zhang, X., Korpelainen, H., -li, C. 2006 Microsatellite variation of *Quercus aquifolides* populations at varying altitudes in the wolong natural reserve of china. *Silva Fennica* 40 (3): 407- 415

10. ANEXOS

Anexo 1. Procedencia del material vegetal de *Gmelina arborea* colección Camcore analizado mediante AFLP (Tomado de Hodge and Dvorak 2004)

| CODIGO | CODIGO DE MAPA | PAIS | ESTADO | PROCEDENCIA |
|--------|----------------|-----------|-----------------|--------------|
| C1 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C2 | 4 | Myanmar | Py Oo Lwin | Thin Ka Don |
| C3 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C4 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C5 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C6 | 4 | Myanmar | Py Oo Lwin | Thin Ka Don |
| C7 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C8 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C12 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C13 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C14 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Sin thaut |
| C16 | 1 | Tailandia | Kanchanaburi | Saiyoke |
| C17 | 3 | Tailandia | Nakonratchasima | Pak chong |
| C19 | 1 | Tailandia | Kanchanaburi | Saiyoke |
| C20 | 1 | Tailandia | Kanchanaburi | Saiyoke |
| C21 | 2 | Tailandia | Chantaburi | Pong Nam Ron |
| C23 | 2 | Tailandia | Chantaburi | Pong Nam Ron |
| C24 | 1 | Tailandia | Kanchanaburi | Saiyoke |
| C27 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Kintha |
| C28 | 7 | Myanmar | Kattia | Kyuntaw |
| C29 | 7 | Myanmar | Kattia | Kyuntaw |
| C30 | 7 | Myanmar | Kattia | Kyuntaw |
| C32 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C33 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Kintha |
| C34 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C35 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C36 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C39 | N.A | N.A | N.A | N.A |
| C41 | 7 | Myanmar | Kattia | Kyuntaw |
| C43 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C45 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Ladagyi |
| C46 | 5 | Myanmar | Yamajhin | Kintha |
| C48 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C49 | 6 | Myanmar | Katha | Waibon |
| C50 | N.A | N.A | N.A | N.A |

Anexo 2. Protocolos de extracción evaluados

Anexo A. Protocolo de extracción de DNA (Doyle & Doyle 1990 modificado)

1. A 1g de tejido macerado añadir 600µl del buffer de extracción precalentado a 65°C. mezclar por medio de vortex
2. incubar por 20 minutos a 65°C, mezclando por inversión cada 5 minutos.
3. Añadir 600µl de cloroformo - isoamilico (24:1), mezclar por inversión hasta homogenizar.
4. Centrifugar por 10 minutos a 13000 r.p.m.
5. Remover la fase acuosa y pasar a tu tubo nuevo
6. Realizar un lavado con etanol absoluto (2.5 volúmenes) mas acetato de amonio (1/10 de volumen), mezclar por inversión.
7. Incubar durante 2 horas a -20°C.
8. Centrifugar a 13000 r.p.m por cinco minutos
9. Descartar el sobrenadante, lavar el *pellet* con etanol al 75%
10. Centrifugar a 13000 r.p.m por cinco minutos
11. Descartar nuevamente el sobrenadante
12. Dejar secar el *pellet*, para que no quede etanol.
13. Resuspender en 100 µl de agua

Buffer de extracción: CTAB 3%, NACl 1.4 M, EDTA 20mM, Tris-Hcl pH 8 100mM, PVP 1%, B mercaptoetanol 0.2%

Anexo B. Protocolo de extracción Kit Quiagen

1. A 20 mg de tejido macerado agregar 400 µl de buffer Ap1 y 4 µl de RNAsa
2. Incubar 10 minutos a 65°C y mezclar por inversión cada 5 min.
3. Agregar 130 µl del buffer Ap2, mezclar e incubar cinco min en hielo.
4. Centrifugar 5 min a 14000 r.p.m.
5. Pasar el lisado (fase acuoso) al a columna de color morado.
6. Centrifugar por dos minutos a 14000 r.p.m.
7. Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo; aproximadamente 450 µl.
8. Agregar 1.5 volúmenes de Ap3 mezclar por pipeteado.
9. pasar 650 µl de la mezcla, incluyendo cualquier precipitado en la columna de color blanco.
10. Centrifugar a 8000 r.p.m. y eliminar lo que queda en el tubo colector.
11. Agregar a la columna con un nuevo tubo colector 500 µl de AW.
12. Centrifugar a 8000 r.p.m.
13. Agregar a la columna con un nuevo tubo colector 500 µl de AW.
14. Centrifugar a 14000 r.p.m.
15. Agregar 100 µl de AE, dejar incubar por cinco minutos a temperatura ambiente.
16. Centrifugar 1 minuto a 8000 r.p.m.

Anexo C. Protocolo de extracción Stefenon *et al.* 2004

1. Añadir 1.5ml del buffer de extracción, precalentado a 65°C, a 150mg de tejido macerado; mezclar y dividir la muestra en dos tubos.
2. Incubar a 65°C por 40 minutos, invirtiendo los tubos cada 15 minutos.

3. Dejar a temperatura ambiente por 1 minuto.
4. Añadir 600 µl de cloroformo-isoamilico (24:1)
5. Agitar por inversión tres minutos hasta homogenizar.
6. Centrifugar a 13000 gravedades por 5 minutos.
7. transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
8. Agregar 5 µl de RNAsa, incubar a 34°C por 40 minutos
9. Adicionar 600 µl de cloroformo-isoamilico (24:1), homogenizar por tres minutos
10. Centrifugar a 13000 gravedades por 5 minutos
11. transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
12. Añadir 50 µl de la solucion1y 50 µl de acetato de sodio.
13. Adicionar 600 µl de cloroformo-isoamilico (24:1), homogenizar por tres minutos
14. Centrifugar a 13000 gravedades por 5 minutos.
15. transferir el sobrenadante a un tubo nuevo
16. Adicionar 1 volumen de isopropanol y 1/10 del volumen de acetato de potasio - 20°C incubar a -20°C por 30 minutos.
17. Centrifugar a 4000g por cinco minutos.
18. Descartar el sobrenadante.
19. Lavar con etanol al 75%, incubar a -20°C por 10minutos.
20. Centrifugar, descartar el sobrenadante.
21. Dejar secar y resuspender en 100 µl de agua.

Buffer de extracción: CTAB 2%, NACL 1.5mM, EDTA 20mM, Tris-HCl pH 8 10mM, PVP 2%, B mercaptoetanol 1%

Solución 1: CTAB 10%, NaCl 1.4 M

Anexo 3. Protocolo de tinción de plata

1. Después de finalizada la electroforesis el vidrio con el gel adherido se coloca hacia arriba en una cubeta con solución fijadora durante 20 minutos.
2. Lavar con agua desionizada durante tres minutos (dos veces) con agitación constante.
3. Después de los lavados el gel se introduce en la solución de tinción por 30 minutos en total oscuridad (tapando la bandeja).
4. El exceso de plata se retira lavando el gel con agua destilada por 10 segundos (este paso es crítico para obtener un revelado óptimo).
5. Luego el gel se coloca en una solución fría de revelado durante cinco minutos aproximadamente o hasta que se visualicen las bandas.
6. Una vez visualizadas las bandas, la reacción de revelado se detiene mediante la inmersión del gel en la solución de parada durante cinco minutos.
7. Por último, se enjuaga el gel por cuatro minutos en agua desionizada.
8. Se coloca el gel en un soporte para dejar secar toda la noche.
9. Luego el gel podrá ser fotografiado, analizado en escáner e igualmente se leen los polimorfismos en un transiluminador de luz blanca.

Anexo 4. Pureza y cantidad de DNA de 33 clones de *Gmelina arborea* colección Pizano S.A. Protocolo Stefenon *et al* (2004).

| Nº de clon | 260/280 | Concentración ng/µl |
|-------------------|----------------|----------------------------|
| P1 | 1.71 | 248.5 |
| P15 | 1.76 | 806.9 |
| P24 | 1.8 | 511.7 |
| P31 | 1.94 | 267.7 |
| P32 | 1.83 | 140,71 |
| P37 | 1.72 | 122,14 |
| P38 | 1.9 | 318,89 |
| P40 | 1.92 | 543 |
| P48 | 1.9 | 2469 |
| P49 | 1.74 | 280.5 |
| P51 | 1.7 | 1194.7 |
| P53 | 1.86 | 406.4 |
| P54 | 1.73 | 1120.2 |
| P55 | 1.7 | 245.2 |
| P56 | 1.71 | 1591 |
| P60 | 1.8 | 368.2 |
| P61 | 2.0 | 126.19 |
| P62 | 1.73 | 309,16 |
| P64 | 1.95 | 546 |
| P65 | 1.7 | 347,57 |
| P66 | 1.86 | 467 |
| P67 | 1.96 | 1015.6 |
| P68 | 1.83 | 561 |

| | | |
|-------------|------|--------|
| P75 | 1.7 | 366.2 |
| P78 | 1.74 | 210,73 |
| P79 | 1.84 | 242,67 |
| P84 | 1.85 | 632 |
| P86 | 2 | 918,85 |
| P91 | 1.9 | 977 |
| P94 | 1.85 | 267 |
| P109 | 2 | 704 |
| P112 | 2 | 774 |
| P129 | 1.78 | 2075 |

Anexo 5. Pureza y cantidad de DNA de 35 clones de *Gmelina arborea* colección Camcore Protocolo Stefenon *et al* (2004)

| Nº de clon | 260/280 | Concentración ng/µl |
|-------------------|----------------|----------------------------|
| C1 | 1,83 | 1709,5 |
| C2 | 1,79 | 3494,5 |
| C3 | 1,79 | 2494,5 |
| C4 | 1,84 | 1261,4 |
| C5 | 1,73 | 1681,4 |
| C6 | 1,82 | 1187,1 |
| C7 | 1,73 | 1038,1 |
| C8 | 1,75 | 585,93 |
| C12 | 1,98 | 1489,4 |
| C13 | 1,79 | 1571,3 |
| C14 | 1,79 | 886,42 |
| C16 | 1,7 | 586,92 |
| C17 | 1,93 | 549,43 |
| C19 | 1,82 | 719,7 |
| C20 | 2 | 555,38 |
| C21 | 1,82 | 4830 |
| C23 | 1,88 | 1796 |
| C24 | 1,85 | 1857,8 |
| C27 | 1,71 | 712,56 |
| C28 | 1,89 | 1041,4 |
| C29 | 1,77 | 2011,9 |
| C30 | 1,99 | 412,41 |
| C32 | 1,81 | 1686,5 |

| | | |
|------------|------|--------|
| C33 | 1,77 | 1348,7 |
| C34 | 1,8 | 1149,4 |
| C35 | 1,75 | 1737,8 |
| C36 | 1,81 | 4021,8 |
| C39 | 1,78 | 888,64 |
| C41 | 1,83 | 2422,9 |
| C43 | 1,92 | 548,37 |
| C45 | 1,79 | 2474,7 |
| C46 | 1,75 | 2208 |
| C48 | 1,75 | 2057,1 |
| C49 | 1,73 | 2452,9 |
| C50 | 1.90 | 456.7 |

Anexo 6. Perfiles genéticos de 33 clones de *Gmelina arborea* colección Pizano S.A

| Clon | Formula genotípica | | | | | | | | | | |
|------|---|----------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| P1 | A330 A326 A310 A309 A294 A287 A282 A269 A250 A246 A236 A186 A185 A152 A150 A139 A138 A136 A135 | | | | | | | | | | |
| | B325 | B253 B170 | B233 B162 | B228 B161 | B215 B160 | B210 B155 | B208 B142 | B189 B141 | B188 | B180 | B171 |
| | C260 C150 | C240 C134 | C239 C132 | C225 C117 | C219 C115 | C215 | C185 | C183 | C169 | C164 | C152 |
| P15 | A330 A326 A320 A310 A294 A246 A236 A224 A222 A195 A194 A186 A185 A184 A151 A150 A142 A141 A138 A136 A135 A122 A121 | | | | | | | | | | |
| | B325 | B253 B161 | B233 B160 | B229 B155 | B216 | B210 | B208 | B192 | B171 | B170 | B162 |
| | C240 C115 | C239 | C225 | C215 | C203 | C172 | C169 | C165 | C136 | C130 | C117 |
| P24 | A330 A326 A310 A294 A282 A257 A250 A246 A236 A224 A204 A199 A195 A194 A186 A185 A163 A162 A152 A150 A138 A136 A135 | | | | | | | | | | |
| | B325 | B254 B194 | B253 B193 | B242 B171 | B240 B170 | B239 B162 | B229 B161 | B222 B160 | B216 B155 | B210 | B208 |
| | C270 | C267 | C240 | C239 | C222 | C215 | C210 | C185 | C183 | C172 | C169 |
| P31 | A330 A326 A320 A310 A300 A290 A269 A250 A246 A236 A233 A227 A200 A199 A190 A189 A185 A184 A180 A179 A178 A177 A151 A150 A141 A139 A124 A122 | | | | | | | | | | |
| | B325 | B255 B193 B152 | B254 B189 B148 | B247 B188 | B240 B171 | B233 B170 | B229 B163 | B224 B162 | B216 B161 | B210 B160 | B194 B155 |
| | C270 | C267 | C261 C183 C115 | C240 C172 | C239 C169 | C222 C165 | C210 C164 | C207 C134 | C199 C132 | C192 C130 | C190 C117 |
| P32 | A330 A326 A310 A300 A294 A290 A282 A269 A250 A246 A232 A227 A196 A195 A194 A181 A180 A179 A152 A151 A150 | | | | | | | | | | |
| | B325 | B300 B194 | B255 B193 | B254 B171 | B242 B170 | B240 B163 | B238 B161 | B224 B157 | B215 | B209 | B208 |
| | C320 | C300 C165 | C292 C147 | C225 C145 | C222 C134 | C207 C132 | C199 C123 | C185 | C175 | C172 | C169 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|----------------------|----------------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| P37 | A330 | A326 A182 | A310 A181 | A294 A180 | A290 A152 | A282 A151 | A269 A150 | A250 A142 | A236 A141 | A233 | A232 |
| | B325 | B262 B181 | B255 B171 | B254 B170 | B242 B163 | B240 B161 | B238 B157 | B229 B150 | B228 B148 | B215 | B209 |
| | C261 | C240 C116 | C225 C115 | C207 | C195 | C172 | C169 | C165 | C164 | C145 | C117 |
| P38 | A330 | A310 A180 | A300 A151 | A290 A150 | A269 A141 | A250 | A236 | A213 | A196 | A195 | A194 |
| | B325 | B300 B157 | B255 | B239 | B215 | B208 | B194 | B193 | B170 | B163 | B161 |
| | C300 | C292 C132 | C276 | C242 | C225 | C199 | C192 | C190 | C172 | C169 | C134 |
| P40 | A330 | A326 A181 | A310 A180 | A294 A179 | A290 A151 | A269 A150 | A250 A141 | A246 A139 | A233 | A232 | A227 |
| | B229 | B207 | B163 | B161 | B158 | B150 | B148 | | | | |
| | C275 | C270 C169 | C261 C165 | C242 C164 | C240 C156 | C225 C152 | C222 C145 | C210 C143 | C195 C117 | C192 C116 | C172 C115 |
| P48 | A330 | A326 | A320 | A312 | A310 | A294 | A290 | A282 | A269 | A250 | A246 |
| | B325 | B310 B217 | B305 B216 | B300 B215 | B292 B195 | B272 B193 | B265 B175 | B255 B174 | B243 B154 | B242 B140 | B228 |
| | C292 | C290 C186 | C276 C185 | C275 C172 | C270 C169 | C267 C147 | C242 C132 | C240 | C222 | C220 | |
| P49 | A330 | A326 A179 | A320 A178 | A310 A164 | A294 A152 | A290 A151 | A269 A150 | A250 A136 | A236 A135 | A181 A134 | A180 |
| | B325 | B248 | B217 | B216 | B175 | B174 | B130 | | | | |
| | C322 | C320 C225 C145 | C300 C222 C132 | C292 C219 | C290 C210 | C276 C186 | C267 C175 | C260 C172 | C253 C165 | C242 C156 | C240 C152 |
| P51 | A330 | A312 A184 | A310 A179 | A257 A176 | A250 A164 | A246 A163 | A236 A142 | A196 A141 | A195 | A186 | A185 |
| | B325 | B305 B130 | B255 | B248 | B217 | B216 | B215 | B195 | B194 | B175 | B174 |
| | C322 | C300 C207 | C292 C190 | C276 C186 | C267 C175 | C242 C172 | C240 C165 | C225 C156 | C222 C152 | C219 C145 | C210 C123 |
| | A330 | A326 A233 | A312 A232 | A310 A215 | A294 A213 | A290 A196 | A282 A195 | A269 A190 | A250 A186 | A246 A185 | A236 A184 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| P53 | A181 | A180 | A179 | A178 | A151 | A150 | A141 | | | | |
| | B217 | B216 B130 | B194 | B193 | B185 | B184 | B154 | B150 | B148 | B142 | B141 |
| | C310 | C276 C186 | C275 C183 | C267 C175 | C260 C172 | C242 C164 | C240 C134 | C225 C123 | C222 C115 | C195 | C190 |
| P54 | A320 | A315 A233 | A312 A232 | A310 A182 | A294 A180 | A290 A179 | A282 | A269 | A250 | A249 | A236 |
| | B325 | B217 | B216 | B193 | B192 | B175 | B174 | B150 | B148 | B140 | |
| | C330 | C322 C220 C172 | C320 C219 C165 | C300 C210 C164 | C292 C203 C147 | C276 C199 C145 | C267 C195 C123 | C242 C190 C115 | C240 C186 | C225 C183 | C222 C175 |
| P55 | A330 | A312 A185 | A310 A181 | A294 A180 | A290 A179 | A282 A151 | A269 A150 | A250 | A246 | A236 | A227 |
| | B325 | B255 B130 | B217 | B216 | B215 | B195 | B194 | B174 | B154 | B150 | B148 |
| | C330 | C322 C220 C172 | C300 C219 C169 | C292 C210 C165 | C276 C203 C164 | C267 C199 C136 | C253 C195 C134 | C242 C190 C132 | C240 C186 C117 | C225 C183 | C222 C175 |
| P56 | A326 | A310 | A294 | A269 | A250 | A236 | A194 | A184 | A150 | | |
| | B325 | B300 | B247 | B217 | B216 | B195 | B194 | B185 | B184 | | |
| | C330 | C322 C225 C156 | C300 C222 C152 | C292 C219 C147 | C276 C210 C145 | C270 C203 C136 | C267 C199 C134 | C260 C195 C132 | C253 C185 C119 | C242 C175 C111 | C240 C172 |
| P60 | A326 | A312 A150 | A310 A142 | A298 A141 | A262 | A257 | A250 | A246 | A181 | A180 | A151 |
| | B325 | B217 | B216 | B215 | B175 | B142 | | | | | |
| | C322 | C300 C225 C169 | C292 C222 C164 | C290 C210 C160 | C276 C203 C156 | C270 C199 C152 | C267 C195 C145 | C260 C190 C143 | C253 C186 C120 | C242 C175 C115 | C240 C172 C105 |
| P61 | A330 | A326 A182 | A310 A181 | A294 A180 | A290 | A282 | A269 | A250 | A246 | A236 | A233 |
| | B325 | B207 | B192 | B152 | B148 | | | | | | |
| | C276 | C275 C120 | C267 C116 | C242 C115 | C240 C111 | C225 | C222 | C210 | C199 | C172 | C164 |
| | A330 | A326 A232 | A312 A227 | A310 A181 | A290 A180 | A282 A150 | A269 | A250 | A246 | A236 | A233 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| P62 | B255 | B243 | B217 | B216 | B175 | B174 | B135 | B120 | B117 | | |
| | C322 | C300 C215 C160 | C292 C210 C152 | C290 C203 C147 | C276 C199 C136 | C267 C192 C134 | C242 C186 C120 | C240 C183 C115 | C225 C175 C111 | C222 C172 C108 | C219 C169 C105 |
| P64 | A330 | A320 A233 | A310 A227 | A294 A182 | A290 A181 | A282 A180 | A269 A150 | A250 | A249 | A246 | A236 |
| | B325 | B217 B117 | B216 | B192 | B184 | B175 | B154 | B152 | B148 | B135 | B120 |
| | C320 | C300 C199 | C290 C195 | C276 C186 | C267 C175 | C242 C172 | C240 C123 | C225 C120 | C222 C111 | C220 C108 | C210 |
| P65 | A330 | A320 | A232 | A181 | A180 | | | | | | |
| | B325 | B255 | B210 | B175 | B163 | B150 | B148 | B120 | B117 | | |
| | C322 | C320 C210 | C310 C207 | C276 C199 | C267 C195 | C242 C190 | C240 C186 | C225 C175 | C222 C172 | C220 C108 | C215 |
| P66 | A330 | A312 | A310 | A282 | A250 | A246 | A236 | A151 | A150 | | |
| | B325 | B240 | B239 | B217 | B216 | B184 | B175 | B154 | B117 | B116 | |
| | C320 | C310 C195 | C292 C190 | C276 C186 | C275 C175 | C242 C172 | C240 | C225 | C222 | C207 | C199 |
| P67 | A330 | A326 A181 | A312 A180 | A310 | A294 | A290 | A282 | A250 | A246 | A236 | A233 |
| | B325 | B247 | B217 | B216 | B154 | B130 | B129 | B116 | | | |
| | C322 | C320 C199 | C276 C195 | C275 C190 | C267 C186 | C242 C175 | C240 C172 | C225 C147 | C222 | C220 | C210 |
| P68 | A330 | A326 A236 | A320 A233 | A312 A181 | A310 A180 | A294 | A290 | A282 | A269 | A257 | A250 |
| | B325 | B255 | B240 | B216 | B215 | B175 | B154 | B135 | B129 | | |
| | C322 | C320 C220 C156 | C300 C210 C150 | C292 C207 C136 | C276 C199 C134 | C275 C195 C112 | C267 C190 | C242 C186 | C240 C185 | C225 C175 | C222 C172 |
| P75 | A330 | A326 A179 | A312 A152 | A310 A141 | A294 A124 | A282 A122 | A269 A121 | A250 A106 | A236 A104 | A181 | A180 |
| | B217 | B216 | B175 | B154 | B135 | B116 | | | | | |
| | C292 | C290 C190 C119 | C267 C185 C112 | C242 C175 | C240 C172 | C225 C164 | C222 C156 | C220 C136 | C210 C134 | C199 C123 | C195 C120 |

| | | | | | | | | | | | |
|------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| P78 | A330 A150 | A310 A124 | A294 A124 | A290 A122 | A269 A121 | A252 | A250 | A236 | A233 | A209 | A208 |
| | B325 | B255 | B240 | B216 | B210 | B175 | B135 | B130 | | | |
| | C276 C183 | C275 C183 | C267 C175 | C242 C172 | C240 C165 | C225 C164 | C222 | C199 | C195 | C190 | C186 |
| P79 | A330 A124 | A326 A124 | A310 A123 | A294 A122 | A290 A121 | A282 | A250 | A236 | A181 | A180 | A150 |
| | B275 | B260 | B233 | B215 | B175 | B148 | B117 | B116 | | | |
| | C330 C195 | C322 C195 | C300 C186 | C267 C175 | C242 C172 | C240 C147 | C230 C145 | C222 | C220 | C219 | C199 |
| P84 | A310 | A294 | A290 | A250 | A236 | A180 | A179 | A124 | A122 | A121 | |
| | B239 | B175 | B158 | B148 | B116 | | | | | | |
| | C290 C186 | C276 C186 | C267 C185 | C242 C175 | C240 C172 | C222 C160 | C220 C147 | C219 C136 | C199 | C195 | C192 |
| P86 | A330 A180 | A326 A180 | A310 A179 | A294 A124 | A290 A122 | A282 A121 | A269 | A250 | A236 | A233 | A181 |
| | B216 | B158 | B148 | B140 | B135 | B130 | | | | | |
| | C322 C199 | C300 C199 | C292 C195 | C276 C192 | C267 C186 | C242 C175 | C240 C172 | C222 C136 | C219 | C215 | C203 |
| P91 | A330 A196 | A326 A196 | A310 A195 | A300 A180 | A294 A179 | A290 A150 | A269 A141 | A250 A124 | A236 A122 | A233 A121 | A227 |
| | B240 | B216 | B215 | B175 | B158 | B130 | | | | | |
| | C320 C195 | C292 C195 | C276 C175 | C267 C172 | C242 | C240 | C222 | C220 | C219 | C207 | C199 |
| P94 | A330 A105 | A312 A105 | A310 A104 | A294 | A290 | A250 | A150 | A141 | A124 | A122 | A106 |
| | B253 | B175 | B148 | | | | | | | | |
| | C240 | C222 | C195 | C186 | C183 | C175 | C172 | | | | |
| P109 | A330 A122 | A326 A122 | A310 A121 | A294 A115 | A290 A111 | A282 A106 | A240 A105 | A239 A104 | A190 | A163 | A124 |
| | B174 | B140 | B139 | B117 | B116 | B105 | | | | | |
| | C276 C160 | C275 C160 | C267 C156 | C240 C136 | C222 C134 | C220 C132 | C219 C123 | C207 C120 | C203 C119 | C165 C117 | C164 C116 |

| | C115 | C112 | C111 | C108 | C107 | C105 | | | | | |
|------|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| P112 | A330 | A326 A151 | A310 A150 | A298 A124 | A294 A122 | A282 A121 | A252 | A236 | A233 | A181 | A180 |
| | B174 | B148 | B130 | B129 | B126 | B116 | | | | | |
| | C292 | C290 C192 C150 C115 | C276 C186 C147 C112 | C275 C175 C145 C111 | C267 C172 C143 C108 | 2C42 C169 C142 C107 | C240 C165 C123 C105 | C222 C164 C120 | C219 C160 C119 | C199 C156 C117 | C195 C152 C116 |
| | A330 | A326 A139 | A310 A138 | A294 A135 | A269 A134 | A205 A133 | A204 A132 | A200 A124 | A199 A121 | A151 | A150 |
| P129 | B325 | B239 B117 | B210 B116 | B208 B105 | B193 | B174 | B158 | B150 | B148 | B129 | B126 |
| | C292 | C290 C175 C123 C105 | C276 C172 C120 | C275 C169 C119 | C240 C165 C117 | C222 C164 C116 | C219 C150 C115 | C199 C147 C112 | C195 C143 C111 | C192 C142 C108 | C186 C136 C107 |

Anexo 7. Perfiles genéticos de 35 clones de *Gmelina arborea* colección Camcore

| Clon | Formula genotípica | | | | | | | | | | |
|------|--------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| C1 | A330 | A309 | A308 | A306 | A294 | A290 | A280 | A279 | A270 | A257 | A254 |
| | | A236 | A235 | A186 | A185 | A184 | A180 | A177 | A176 | A143 | A138 |
| | | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 | A111 | | | | |
| | B325 | B320 | B238 | B233 | B230 | B223 | B222 | B212 | B210 | B175 | B162 |
| | | B161 | B160 | B158 | B152 | B151 | B135 | B134 | B133 | B126 | B125 |
| | | B120 | B114 | B113 | B110 | B106 | B105 | B100 | | | |
| | C330 | C300 | C282 | C275 | C273 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 | C208 |
| | | C198 | C194 | C180 | C179 | C178 | C172 | C168 | C158 | C149 | C147 |
| | | C146 | C139 | C138 | C136 | C135 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 |
| | C110 | C109 | | | | | | | | | |
| C2 | A330 | A309 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 | A257 |
| | | A254 | A236 | A235 | A227 | A200 | A199 | A192 | A191 | A190 | A186 |
| | | A185 | A184 | A180 | A177 | A176 | A138 | A137 | A136 | A134 | A133 |
| | | A132 | A111 | | | | | | | | |
| | B325 | B320 | B247 | B242 | B238 | B233 | B230 | B216 | B212 | B195 | B175 |
| | | B162 | B161 | B160 | B158 | B135 | B134 | B133 | B126 | B125 | B114 |
| | | B113 | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | |
| | C330 | C320 | C295 | C282 | C275 | C273 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 |
| | | C208 | C194 | C180 | C179 | C178 | C168 | C162 | C161 | C155 | C149 |
| | C146 | C139 | C138 | C136 | C135 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | |
| | C110 | C109 | | | | | | | | | |
| C3 | A330 | A326 | A309 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 |
| | | A257 | A254 | A236 | A235 | A192 | A191 | A190 | A186 | A185 | A184 |
| | | A180 | A177 | A176 | A138 | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 | A111 |
| | B325 | B320 | B300 | B275 | B265 | B250 | B242 | B238 | B233 | B230 | B212 |
| | | B210 | B175 | B160 | B158 | B135 | B134 | B133 | B120 | B114 | B113 |
| | | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | |
| | C330 | C320 | C282 | C275 | C273 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 | C208 |
| | | C198 | C180 | C179 | C178 | C172 | C168 | C165 | C149 | C146 | C139 |
| | | C138 | C136 | C135 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | C110 | C109 |
| C4 | A330 | A309 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 | A257 |
| | | A254 | A236 | A235 | A186 | A185 | A184 | A180 | A177 | A176 | A134 |
| | | A133 | A132 | A113 | A112 | A111 | | | | | |
| | B325 | B320 | B305 | B295 | B285 | B275 | B265 | B255 | B250 | B238 | B233 |
| | | B230 | B224 | B218 | B210 | B200 | B190 | B180 | B175 | B169 | B162 |
| | | B161 | B160 | B158 | B152 | B148 | B135 | B134 | B133 | B129 | B120 |
| | | B114 | B113 | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | |
| | C320 | C305 | C300 | C295 | C282 | C275 | C273 | C253 | C246 | C230 | C228 |
| | | C225 | C215 | C210 | C209 | C208 | C198 | C194 | C180 | C179 | C178 |

| | | | | | | | | | | | |
|----|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | C172 C130 | C169 C128 | C161 C126 | C160 C125 | C149 C120 | C146 C110 | C139 C109 | C138 | C136 | C135 |
| C5 | A330 | A326 A257 A138 | A309 A254 A137 | A308 A246 A136 | A306 A236 A134 | A294 A235 A133 | A290 A228 A132 | A282 A227 A111 | A280 A180 | A279 A177 | A270 A176 |
| | B325 | B320 B161 B110 | B302 B160 B106 | B238 B158 B105 | B233 B157 B100 | B216 B135 | B212 B134 | B210 B133 | B180 B120 | B175 B114 | B162 B113 |
| | C320 | C300 C209 C139 C109 | C295 C208 C138 | C282 C198 C136 | C275 C180 C135 | C273 C179 C130 | C253 C178 C128 | C230 C172 C126 | C228 C169 C125 | C225 C149 C120 | C210 C146 C110 |
| C6 | A330 | A326 A236 A136 | A308 A235 A134 | A306 A186 A133 | A294 A185 A132 | A290 A184 A111 | A282 A180 | A280 A177 | A279 A176 | A270 A138 | A257 A137 |
| | B325 | B320 B162 B113 | B242 B161 B110 | B238 B160 B106 | B233 B158 B105 | B216 B157 B100 | B212 B135 | B210 B134 | B202 B133 | B180 B120 | B175 B114 |
| | C330 | C320 C225 C179 C128 | C300 C215 C178 C126 | C282 C210 C169 C125 | C275 C209 C149 C120 | C273 C208 C146 C110 | C268 C198 C139 C109 | C246 C194 C138 | C243 C190 C136 | C230 C185 C135 | C228 C180 C130 |
| C7 | A330 | A326 A254 A138 | A308 A236 A137 | A306 A235 A136 | A294 A228 A134 | A290 A186 A133 | A282 A185 A132 | A280 A184 A111 | A279 A180 | A270 A177 | A257 A176 |
| | B325 | B320 B175 B114 | B315 B162 B113 | B300 B161 B110 | B242 B160 B106 | B238 B158 B105 | B233 B157 B100 | B216 B135 | B212 B134 | B210 B133 | B180 B120 |
| | C330 | C320 C228 C179 C126 | C300 C225 C178 C125 | C282 C210 C169 C120 | C275 C209 C146 C110 | C273 C208 C139 C109 | C268 C198 C138 | C243 C194 C136 | C235 C190 C135 | C232 C185 C130 | C230 C180 C128 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|--|--|--|--|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|
| C8 | A330 | A308 A236 A136 | A306 A235 A134 | A294 A186 A133 | A290 A185 A132 | A282 A184 A111 | A280 A180 | A279 A177 | A270 A176 | A257 A138 | A254 A137 |
| | B325 | B320 B180 B133 | B302 B162 B120 | B290 B161 B114 | B272 B160 B113 | B242 B158 B110 | B238 B157 B106 | B233 B148 B105 | B216 B146 B100 | B212 B135 | B210 B134 |
| | C330 | C320 C225 C165 C109 | C300 C210 C146 | C295 C209 C139 | C282 C198 C138 | C275 C190 C130 | C273 C180 C128 | C243 C179 C126 | C232 C178 C125 | C230 C175 C120 | C228 C172 C110 |
| C12 | A330 | A309 A236 A136 | A308 A235 A134 | A306 A186 A133 | A294 A185 A132 | A290 A184 A111 | A280 A180 | A279 A177 | A270 A176 | A257 A138 | A254 A137 |
| | B325 | B320 B175 B114 | B315 B171 B113 | B295 B170 B110 | B285 B163 B106 | B242 B161 B105 | B238 B160 B100 | B223 B157 | B216 B135 | B205 B134 | B180 B133 |
| | C320 | C305 C208 C125 | C282 C198 C120 | C275 C190 C110 | C273 C180 C109 | C230 C179 | C228 C178 | C225 C146 | C215 C130 | C210 C128 | C209 C126 |
| C13 | A330 | A326 A254 A176 | A309 A236 A138 | A308 A235 A137 | A306 A228 A136 | A294 A227 A134 | A290 A186 A133 | A280 A185 A132 | A279 A184 A111 | A270 A180 A110 | A257 A177 |
| | B325 | B320 B223 B157 B100 | B315 B216 B135 | B290 B205 B134 | B275 B180 B133 | B272 B175 B115 | B262 B171 B114 | B250 B170 B113 | B247 B163 B110 | B242 B161 B106 | B238 B160 B105 |
| | C320 | C312 C209 C168 C152 C136 C110 | C295 C208 C165 C150 C135 C109 | C282 C198 C164 C163 C149 C134 | C275 C190 C163 C162 C147 C132 | C273 C180 C162 C146 C130 | C250 C179 C161 C145 C128 | C230 C178 C160 C143 C126 | C228 C175 C158 C142 C125 | C225 C172 C156 C139 C123 | C210 C169 C155 C138 C120 |
| C14 | A330 | A326 A236 A138 | A308 A235 A137 | A306 A228 A136 | A294 A227 A134 | A290 A186 A133 | A280 A185 A132 | A279 A184 A111 | A270 A180 | A257 A177 | A254 A176 |
| | B325 | B320 B223 B148 B100 | B315 B216 B146 | B302 B180 B135 | B280 B175 B134 | B272 B171 B133 | B262 B170 B114 | B250 B163 B113 | B247 B161 B110 | B242 B160 B106 | B238 B157 B105 |
| | C330 | C320 C210 | C305 C209 | C282 C208 | C275 C204 | C273 C202 | C268 C198 | C250 C190 | C230 C180 | C228 C179 | C225 C178 |

| | | C168 | C165 | C146 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | C110 | C109 |
|-----|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C16 | A330 | A308 A235 A132 | A306 A228 A111 | A294 A227 | A290 A180 | A280 A177 | A279 A176 | A270 A137 | A257 A136 | A254 A134 | A236 A133 |
| | B325 | B320 B238 B135 | B315 B223 B134 | B302 B216 B133 | B275 B180 B114 | B265 B175 B113 | B256 B163 B110 | B254 B162 B106 | B250 B161 B105 | B247 B160 B100 | B242 B157 |
| | C330 | C320 C209 C130 | C305 C198 C128 | C282 C190 C126 | C275 C180 C125 | C273 C179 C120 | C260 C178 C110 | C230 C175 C109 | C228 C172 | C225 C162 | C210 C146 |
| C17 | A330 | A308 A246 A176 | A306 A236 A137 | A294 A235 A136 | A290 A192 A134 | A282 A191 A133 | A280 A186 A132 | A279 A185 A111 | A270 A184 | A257 A180 | A254 A177 |
| | B325 | B320 B218 B113 | B315 B216 B110 | B302 B180 B106 | B300 B175 B105 | B295 B163 B100 | B290 B162 | B250 B135 | B247 B134 | B242 B133 | B238 B114 |
| | C320 | C282 C175 | C273 C146 | C230 C130 | C228 C128 | C225 C126 | C210 C125 | C198 C120 | C180 C110 | C179 C109 | C178 |
| C19 | A330 | A309 A270 A199 A136 | A308 A257 A192 A134 | A307 A254 A186 A133 | A306 A246 A185 A132 | A294 A236 A184 A111 | A290 A235 A180 | A282 A215 A177 | A280 A214 A176 | A279 A205 A138 | A275 A200 A137 |
| | B325 | B320 B219 B135 | B315 B202 B134 | B300 B180 B133 | B275 B175 B114 | B260 B163 B113 | B256 B162 B110 | B242 B161 B106 | B238 B158 B105 | B233 B151 B100 | B224 B150 |
| | C320 | C305 C180 C125 | C295 C179 C120 | C282 C178 C110 | C230 C165 C109 | C228 C146 | C225 C143 | C210 C142 | C209 C130 | C198 C128 | C194 C126 |
| C20 | A330 | A309 A257 A180 | A308 A254 A177 | A307 A246 A176 | A306 A236 A138 | A294 A235 A137 | A290 A228 A136 | A282 A227 A134 | A280 A186 A133 | A279 A185 A132 | A270 A184 A111 |
| | B325 | B320 B238 B158 B106 | B315 B222 B151 B105 | B295 B220 B150 B100 | B285 B216 B135 | B275 B210 B134 | B265 B180 B133 | B260 B175 B115 | B255 B163 B114 | B254 B162 B113 | B247 B161 B110 |
| | C320 | C300 C209 C126 | C295 C198 C125 | C282 C180 C120 | C275 C179 C110 | C273 C178 C109 | C250 C146 | C230 C143 | C228 C142 | C225 C130 | C210 C128 |
| | A330 | A326 A257 A180 | A308 A254 A177 | A307 A246 A176 | A306 A236 A138 | A294 A235 A137 | A290 A215 A136 | A282 A214 A134 | A280 A186 A133 | A279 A185 A132 | A270 A184 A111 |

| | | | | | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| C21 | B325 | B320 | B315 | B285 | B275 | B265 | B260 | B255 | B254 | B247 | B238 | | | | |
| | B224 | B216 | B210 | B202 | B180 | B175 | B163 | B162 | B161 | B158 | B150 | | | | |
| | B151 | B150 | B135 | B134 | B133 | B115 | B114 | B113 | B110 | B106 | | | | | |
| | B105 | B100 | | | | | | | | | | | | | |
| | C320 | C300 | C282 | C275 | C273 | C260 | C253 | C230 | C228 | C225 | C210 | | | | |
| | C209 | C208 | C198 | C194 | C190 | C185 | C180 | C179 | C178 | C172 | | | | | |
| | C168 | C165 | C146 | C143 | C142 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | | | | | |
| | C110 | C109 | | | | | | | | | | | | | |
| C23 | A330 | A326 | A309 | A308 | A307 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | | | | |
| | A270 | A262 | A257 | A254 | A246 | A242 | A236 | A235 | A228 | A192 | | | | | |
| | A191 | A186 | A185 | A180 | A177 | A176 | A164 | A157 | A155 | A138 | | | | | |
| | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 | A119 | A118 | A111 | | | | | | | |
| | B325 | B320 | B305 | B262 | B247 | B238 | B224 | B180 | B175 | B163 | B162 | | | | |
| | B161 | B158 | B151 | B150 | B135 | B134 | B133 | B115 | B114 | B113 | | | | | |
| | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | | | | | | |
| | C300 | C295 | C282 | C275 | C273 | C260 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 | | | | |
| | C208 | C198 | C180 | C179 | C178 | C146 | C139 | C138 | C136 | C135 | | | | | |
| | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | C110 | C109 | | | | | | | | |
| C24 | A330 | A326 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 | A257 | A236 | A235 | A228 | A214 |
| | A186 | A185 | A184 | A180 | A177 | A176 | A138 | A137 | A136 | A111 | | | | | |
| | B325 | B320 | B315 | B300 | B275 | B238 | B224 | B212 | B180 | B175 | B174 | B163 | B162 | B161 | B135 |
| | B134 | B133 | B115 | B114 | B113 | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | |
| | C330 | C320 | C300 | C282 | C275 | C273 | C260 | C246 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 | C208 | C198 |
| | C180 | C179 | C178 | | C172 | C163 | C146 | C139 | C138 | C136 | C135 | C130 | C128 | C126 | C125 |
| | C120 | C110 | C109 | | | | | | | | | | | | |
| C27 | A330 | A326 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 | A257 | | | | |
| | A254 | A246 | A236 | A235 | A186 | A185 | A184 | A180 | A177 | A176 | | | | | |
| | A138 | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 | A111 | | | | | | | | |
| | B325 | B320 | B315 | B305 | B275 | B272 | B255 | B247 | B242 | B230 | B224 | | | | |
| | B220 | B219 | B218 | B216 | B212 | B210 | B195 | B180 | B174 | B171 | | | | | |
| | B169 | B168 | B167 | B163 | B162 | B135 | B134 | B133 | B115 | B114 | | | | | |
| | B113 | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | | | | | |
| | C330 | C320 | C295 | C282 | C275 | C273 | C230 | C228 | C225 | C210 | C209 | | | | |
| | C208 | C198 | C180 | C179 | C178 | C175 | C169 | C168 | C165 | C158 | | | | | |
| | C146 | C139 | C138 | C136 | C135 | C130 | C128 | C126 | C125 | C120 | | | | | |
| | C110 | C109 | | | | | | | | | | | | | |
| C28 | A330 | A326 | A309 | A308 | A306 | A294 | A290 | A282 | A280 | A279 | A270 | | | | |
| | A257 | A254 | A246 | A236 | A235 | A228 | A186 | A185 | A184 | A180 | | | | | |
| | A177 | A176 | A138 | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 | A111 | | | | | | |
| | B325 | B320 | B315 | B305 | B295 | B272 | B260 | B247 | B242 | B230 | B224 | | | | |
| | B220 | B219 | B218 | B216 | B212 | B210 | B180 | B174 | B169 | B168 | | | | | |
| | B167 | B163 | B162 | B135 | B134 | B133 | B120 | B115 | B114 | B113 | | | | | |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | |
| | C295 | C228 C126 | C225 C125 | C205 C120 | C180 C110 | C179 C109 | C178 | C169 | C168 | C130 | C128 |
| C29 | A326 | A306 A192 A134 | A270 A191 A133 | A257 A190 A132 | A254 A185 A119 | A236 A184 A118 | A235 A180 A111 | A214 A177 | A212 A176 | A200 A137 | A199 A136 |
| | B325 | B320 B163 B106 | B305 B162 B105 | B275 B135 B100 | B254 B134 | B242 B133 | B220 B120 | B219 B115 | B169 B114 | B168 B113 | B167 B110 |
| | C290 | C282 C178 C109 | C273 C169 | C268 C138 | C246 C136 | C230 C135 | C228 C130 | C208 C128 | C198 C125 | C194 C120 | C179 C110 |
| C30 | A330 | A326 A270 A138 | A309 A257 A137 | A308 A254 A136 | A307 A236 A134 | A306 A235 A133 | A294 A185 A132 | A290 A184 A111 | A282 A180 | A280 A177 | A279 A176 |
| | B325 | A320 A220 A162 A106 | A315 A219 A158 A105 | A305 A212 A135 A100 | A302 A210 | A300 A202 A133 | A265 A180 A120 | A247 A174 A115 | A242 A169 A114 | A230 A167 A113 | A224 A163 A110 |
| | C312 | C295 C225 C162 C109 | C290 C208 C139 | C282 C205 C138 | C273 C204 C136 | C268 C198 C135 | C263 C179 C130 | C260 C175 C128 | C243 C168 C125 | C230 C165 C120 | C228 C163 C110 |
| C32 | A330 | A308 A236 A132 | A307 A235 A111 | A306 A228 | A294 A180 | A282 A177 | A280 A176 | A279 A137 | A270 A136 | A257 A134 | A254 A133 |
| | B325 | B320 B230 B162 B114 | B315 B224 B160 B113 | B305 B220 B158 B110 | B302 B219 B152 B106 | B300 B195 B151 B105 | B282 B180 B135 B100 | B280 B174 B134 | B254 B169 B133 | B250 B167 B120 | B247 B163 B115 |
| | C312 | C282 C198 C110 | C273 C175 C109 | C268 C168 | C263 C165 | C230 C163 | C228 C139 | C225 C138 | C208 C136 | C205 C135 | C204 C120 |
| C33 | A257 | A254 A111 | A236 | A235 | A180 | A177 | A137 | A136 | A134 | A133 | A132 |
| | B325 | B320 B200 B134 | B315 B174 B133 | B310 B169 B120 | B305 B167 B115 | B265 B163 B113 | B254 B162 B110 | B250 B157 B106 | B242 B152 B105 | B220 B151 B100 | B219 B135 |
| | C320 | C312 C198 | C290 C175 | C268 C168 | C263 C165 | C230 C139 | C228 C138 | C225 C136 | C205 C135 | C204 C120 | C200 C110 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| | C109 | | | | | | | | | | |
| C34 | A330 | A257 A136 | A254 A134 | A244 A133 | A242 A132 | A236 A111 | A235 | A180 | A177 | A176 | A137 |
| | B300 | B295 | B218 | B212 | B135 | B134 | B133 | B120 | B115 | B114 | B100 |
| | C320 | C312 C198 C135 | C268 C194 C120 | C263 C175 C110 | C246 C169 C109 | C230 C168 | C228 C162 | C225 C161 | C205 C139 | C204 C138 | C200 C136 |
| C35 | A306 | A257 A137 | A254 A136 | A236 A134 | A235 A133 | A186 A132 | A185 A111 | A184 | A180 | A177 | A176 |
| | B325 | B320 B219 B152 | B315 B202 B151 | B305 B200 B135 | B302 B174 B134 | B254 B169 B133 | B250 B168 B122 | B247 B163 B120 | B238 B162 B115 | B230 B160 B114 | B220 B158 B100 |
| | C320 | C312 C228 C138 | C295 C225 C136 | C282 C205 C135 | C275 C204 C120 | C268 C198 C110 | C263 C179 C109 | C260 C175 | C235 C169 | C232 C168 | C230 C139 |
| C36 | A320 | A314 A246 A199 A119 | A310 A244 A186 A118 | A308 A242 A185 A111 | A306 A240 A184 | A294 A236 A180 | A290 A235 A137 | A282 A232 A136 | A280 A219 A134 | A257 A205 A133 | A250 A200 A132 |
| | B325 | B320 B163 | B254 B160 | B247 B148 | B238 B146 | B230 B120 | B220 B115 | B200 B114 | B169 B100 | B168 | B167 |
| | C295 | C290 C198 | C273 C179 | C268 C175 | C263 C139 | C260 C138 | C246 C136 | C232 C135 | 2C25 C120 | C209 C110 | C204 C109 |
| C39 | A306 | A236 A176 | A235 A172 | A234 A171 | A233 A137 | A232 A134 | A205 A133 | A200 A132 | A199 A111 | A180 | A177 |
| | B325 | B320 B114 | B275 B100 | B220 | B218 | B210 | B205 | B163 | B162 | B120 | B115 |
| | C263 | C205 C109 | C198 | C169 | C155 | C139 | C138 | C136 | C135 | C120 | C110 |
| C41 | A309 | A308 A180 A118 | A307 A177 A111 | A245 A176 | A236 A172 | A235 A171 | A212 A137 | A205 A134 | A200 A133 | A192 A132 | A190 A119 |
| | B315 | B305 B162 | B265 B160 | B250 B158 | B247 B135 | B220 B134 | B212 B133 | B169 B100 | B168 | B167 | B163 |
| | C273 | C230 C139 | C228 C136 | C225 C135 | C204 C130 | C198 C126 | C165 C125 | C163 C120 | C155 C110 | C143 C109 | C142 |
| | A330 | A326 A270 | A309 A257 | A308 A254 | A307 A245 | A300 A236 | A290 A235 | A287 A228 | A282 A227 | A280 A180 | A279 A177 |

| | | | | | | | | | | | |
|-----|------|------------------------------|------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| C43 | A176 | A137 | A134 | A133 | A132 | A119 | A118 | A111 | | | |
| | B325 | B320 B190 B135 | B315 B174 B134 | B305 B169 B133 | B272 B168 B130 | B250 B167 B129 | B247 B163 B126 | B220 B162 B122 | B219 B160 B114 | B205 B158 B100 | B195 B148 |
| | C312 | C305 C143 C120 | C290 C142 C110 | C273 C139 C109 | C263 C138 | C230 C136 | C228 C135 | C225 C130 | C202 C128 | C198 C126 | C175 C125 |
| C45 | A309 | A308 A192 A133 | A307 A190 A132 | A300 A180 A111 | A257 A177 | A254 A176 | A245 A172 | A236 A171 | A235 A137 | A234 A136 | A233 A134 |
| | B325 | B320 B133 | B238 B114 | B222 B100 | B220 | B169 | B168 | B167 | B146 | B135 | B134 |
| | C312 | C263 C163 C110 | C260 C160 C109 | C250 C143 | C243 C142 | C205 C138 | C204 C130 | C202 C128 | C198 C126 | C175 C125 | C172 C120 |
| C46 | A330 | A300 A136 | A257 A134 | A236 A133 | A235 A132 | A186 A111 | A185 A80 | A180 | A177 | A176 | A137 |
| | B325 | B320 B219 B152 B114 | B305 B205 B151 B100 | B285 B190 B150 | B280 B174 B135 | B254 B169 B134 | B250 B168 B133 | B247 B167 B130 | B230 B163 B129 | B223 B162 B126 | B220 B158 B122 |
| | C305 | C282 C168 | C275 C155 | C268 C149 | C263 C146 | C260 C142 | C204 C138 | C202 C136 | C198 C128 | C175 C126 | C172 C120 |
| C48 | A300 | A257 A136 | A254 A134 | A236 A133 | A235 A132 | A186 A111 | A185 A80 | A180 | A177 | A176 | A137 |
| | B325 | B320 B114 | B305 B100 | B256 | B220 | B219 | B135 | B134 | B133 | B126 | B125 |
| | C260 | C230 C128 | C228 C126 | C225 C125 | C198 C120 | C194 | C172 | C162 | C161 | C160 | C158 |
| C49 | A330 | A300 A133 | A257 A132 | A254 A111 | A186 A80 | A180 | A177 | A176 | A137 | A136 | A134 |
| | B325 | B254 B134 | B220 B133 | B219 B114 | B212 B113 | B205 B110 | B200 B106 | B190 B105 | B168 B100 | B163 | B135 |
| | C268 | C198 | C175 | C172 | C149 | C128 | C126 | C125 | C120 | | |
| C50 | A320 | A310 A240 A177 | A309 A236 A176 | A306 A235 A137 | A300 A200 A136 | A290 A199 A134 | A282 A192 A133 | A280 A190 A132 | A262 A186 A111 | A249 A185 A80 | A245 A180 |
| | B302 | B285 B152 | B275 B151 | B272 B150 | B254 B148 | B223 B135 | B219 B134 | B200 B133 | B195 B122 | B174 B114 | B162 B113 |

| | | | | | | | | | | | |
|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|------|--|
| | B110 | B106 | B105 | B100 | | | | | | | |
| C320 | C300 | C295 | C290 | C273 | C260 | C246 | C235 | C232 | C228 | C208 | |
| | C198 | C180 | C175 | C172 | C146 | C125 | C123 | C120 | | | |