



UNIVERSIDAD DISTRITAL
FRANCISCO JOSÉ DE CALDAS



Determinación del tamaño del genoma de *Gmelina arborea* Roxb. utilizando citometría de flujo

Gmelina arborea Roxb. genome-size determination using flow cytometry

Mary Luz Yaya Lancheros¹  y Wilson Terán² 

Yaya-Lancheros, M.L. y Terán, W. (2020). Determinación del tamaño del genoma de *Gmelina arborea* Roxb. utilizando citometría de flujo. *Colombia forestal*, 23(1), 68-78.

Recepción: 30 de mayo 2019

Aprobación: 16 de diciembre 2019

Resumen

La melina es una especie forestal con una alta calidad maderable y de importancia económica para diferentes países tropicales como Colombia. No obstante, existe poca información acerca de su genética, lo cual es pertinente en programas de mejoramiento. Con el fin de determinar el tamaño del genoma de *Gmelina arborea* (valor C), se obtuvieron suspensiones nucleares a partir de hojas, las cuales se analizaron mediante citometría de flujo. Para la obtención de suspensiones acuosas de núcleos, se evaluaron cuatro buffers de extracción, de los cuales, el buffer LB01 produjo poblaciones nucleares intactas y con mayor homogeneidad. Se analizaron tres especies vegetales como posibles estándares para la determinación del valor C; utilizando tomate como estándar referente, se obtuvo un valor C para melina de 467 Mpb. Este es el primer reporte relacionado con la estimación del valor C en melina, por lo que se genera así información importante para incrementar el conocimiento relacionado con esta especie.

Palabras clave: aislamiento de núcleos, fluorescencia, valor C.

Abstract

Melina, also known as white teak, is a species of high timber quality and economic importance for different tropical countries like Colombia. However, information about its genetics is scarce, which is relevant for breeding programs. In order to determine the genome size of *Gmelina arborea* (C value), nuclei suspensions were obtained from leaves, and analyzed using flow cytometry. To obtain aqueous nuclei suspensions, four extraction buffers were evaluated, LB01 buffer produced intact populations with greater homogeneity. Three species were analyzed as possible reference standards for the determination of the C value; using tomato as a reference species, a C value for melina of 467 Mpb was obtained. This is the first report related to the estimation of the C value in *Gmelina arborea*, generating important information to increase knowledge related to this species

Keywords: C-value, fluorescence, nuclei isolation.

1 Biología de Plantas y Sistemas Productivos, Departamento de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. myaya@javeriana.edu.co

2 Biología de Plantas y Sistemas Productivos, Departamento de Biología. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia. wteran@javeriana.edu.co

INTRODUCCIÓN

La melina *Gmelina arborea* Roxb, también conocida como teca blanca, es una especie arbórea nativa del sur de Asia, de alta importancia económica en distintas áreas tropicales y subtropicales de Asia y América, especialmente en países como Costa Rica, Venezuela y Colombia (Dvorak, 2004; Urrego, 2004). La especie presenta características como el rápido crecimiento, siendo productiva entre los 3 y 4 años, alta producción de biomasa (20-25 m³.ha⁻¹.año⁻¹) y potencial de su biomasa lignocelulósica como fuente de biocombustibles (Dvorak, 2004; González-Rojas, Murillo-Cruz y Ávila-Arias, 2016; Moya y Tomazello, 2006; Tenorio et al., 2016). Su madera ha sido utilizada principalmente en la elaboración de productos como contrachapados y cartón corrugado; aunque, también se ha demostrado su utilidad en el establecimiento de sistemas agroforestales y programas de reforestación. Además, se ha reportado que la melina presenta naturalmente tolerancia a estrés hídrico, una característica de alto interés agronómico (Dvorak, 2004; Rojas et al., 2012).

En Colombia compañías como Monterrey Forestal y Smurfit Kappa Cartón de Colombia han establecido plantaciones comerciales principalmente en la zona del caribe seco tropical, Chocó, Urabá, y también en zonas del interior como Cundinamarca y Tolima. Estas zonas, principalmente las del Caribe, están sometidas anualmente a épocas de déficit hídrico, por lo cual el desarrollo de investigaciones que emplean estrategias genómicas para la identificación de genes de tolerancia a sequía u otros genes de interés constituye una oportunidad para impulsar el establecimiento de programas de mejoramiento avanzados para esta especie, además de contribuir en un mayor conocimiento de su biología, frente a estas u otras respuestas complejas.

El contenido de ADN haploide del genoma de un organismo se conoce como valor C (Doležel, Greilhuber y Suda, 2007; Doležel y Greilhuber, 2010), y su determinación es importante en distintas áreas de investigación como taxonomía,

sistemática y filogenia, así como para aproximaciones genómicas o de genómica funcional como la transcriptómica. Además de estimar el tamaño del genoma, el valor C también permite analizar los niveles de ploidía de la especie, así como el ciclo celular (Bennett, 2005; Doležel y Greilhuber, 2010; Vrána et al., 2014).

Para la estimación del valor C frecuentemente se utiliza la citometría de flujo, método basado en la medición de la intensidad de la fluorescencia relativa emitida por un agente fluorescente ADN-selectivo y estoquiométrico como yoduro de propidio o DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) (Doležel et al., 2007; Sliwinska, 2018). Este método ha demostrado ser rápido, confiable y permite procesar grandes cantidades de muestras en poco tiempo. Como muestras se utilizan generalmente núcleos en suspensión líquida, aislados de tejido vegetal fresco y teñidos con el agente fluorescente (Vrána et al., 2014, Bourge, Brown y Siljak-Yakovlev, 2018), lo cual requiere una etapa de optimización de los protocolos de extracción para lograr obtener una población homogénea de núcleos intactos. Para determinar el contenido de ADN en unidades absolutas, picogramos (pg) o megapares de bases (Mpb) (1 pg = 978 Mpb), se compara la intensidad de la fluorescencia de los núcleos vegetales de la especie de interés durante la fase del ciclo celular G0/G1 (representa el contenido de ADN 2C en una especie diploide) con la intensidad de fluorescencia G0/G1 de los núcleos de una especie de referencia con tamaño de genoma conocido y empleada como estándar (Doležel, Doleželová y Novák, 1994; Doležel, 2005). Mediante esta técnica se puede obtener información de amplia utilidad en diferentes áreas como sistemática, evolución, fitomejoramiento o genómica (Aliyu, 2012). A pesar de la importancia que implica determinar el tamaño del genoma para una especie, Pellicer et al., (2018) indican que solo se han reportado valores C para cerca de un 3 % de las angiospermas y un 41 % de las gimnospermas.

La melina es una especie diploide con 38-40 cromosomas (Prota, 2016). No obstante, a pesar

de su importancia económica como especie maderable en el trópico, son aún incipientes las investigaciones existentes a nivel genético, filogenético o de genómica funcional que permitan un mayor desarrollo de programas de mejoramiento. En este artículo se reporta por primera vez la estimación del tamaño del genoma haploide de la melina, empleando citometría de flujo. Se describe igualmente una metodología sencilla que puede ser replicada a otras especies con el mismo objetivo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Para la obtención de muestras se utilizaron plántulas de *G. arborea* de aproximadamente dos semanas de edad, las cuales fueron germinadas a partir de semillas comerciales, y mantenidas en condiciones de cuarto de crecimiento a una temperatura promedio de 28°C y fotoperiodo de 14h luz/10h oscuridad. Como especies estándar previamente reportadas en la literatura (Doležel, 2005), se utilizaron plántulas obtenidas a partir de semillas de soya *Glycine max* cv Polanka (valor 2C= 2.50 pg), tomate *Solanum lycopersicum* cv 'Stupické' (valor 2C 1.96 pg) y rábano *Raphanus sativus* cv 'Saxa' (valor 2C= 1.11 pg) (Doležel, 2005).

Las semillas se germinaron en oscuridad, a una temperatura de 25°C; posteriormente, las plantas se mantuvieron en cuarto de crecimiento a 25°C y con fotoperiodo de 14h luz / 10 h oscuridad.

Aislamiento de núcleos y evaluación de buffers de extracción

Se tomaron entre 50 y 100 mg de tejido foliar proveniente de las diferentes especies. Las muestras se maceraron en distintos buffers reportados previamente como útiles en la obtención de núcleos para análisis de citometría de flujo (tabla 1). La maceración se realizó en hielo utilizando una hoja

de cuchilla de rasurar y 1 ml de cada tipo de buffer, de acuerdo con las recomendaciones indicadas por Doležel (2005).

La suspensión de núcleos fue ajustada a un volumen de 1 ml con el mismo buffer y fue filtrada a través de una malla de nailon de 30 µm. Para evitar la contaminación con RNA, se adicionó RNAsa en una concentración de 50 µg. ml⁻¹. Los núcleos fueron posteriormente teñidos con el agente fluorescente Picogreen® (10 uM), el cual presenta alta afinidad por el ADN doble cadena, y se incubaron en oscuridad por 30 minutos en hielo. Luego se analizó cualitativamente la presencia, densidad e integridad (forma circular nítida) de los núcleos extraídos empleando un microscopio de fluorescencia invertido (Axiovert 25, Zeiss). Esta evaluación de la calidad e integridad de los núcleos extraídos fue complementada por el análisis de citometría descrito de manera posterior.

Evaluación de los núcleos vegetales y determinación del valor C por citometría de flujo

Para la determinación del valor C de melina por citometría de flujo se empleó el protocolo de extracción de núcleos descrito anteriormente, utilizando como agente fluorescente para la tinción yoduro de propidio (50 µM); previamente, la suspensión nuclear fue tratada con RNAsa (50 µg.ml⁻¹) y se incubó con el agente fluorescente en oscuridad durante 30 minutos en hielo.

Las suspensiones nucleares fueron posteriormente analizadas en un citómetro Guava easycyte®, utilizando un láser de luz azul para la excitación del yoduro de propidio a 536 nm. Las lecturas se realizaron en el canal de fluorescencia amarilla (583/26 nm), utilizando cerca de 5000 partículas por lectura, y realizando 3 réplicas independientes para cada especie.

Para la selección de la especie que se emplearía como estándar, se compararon los picos de fluorescencia G0/G1 de muestras de núcleos de soya, rábano y tomate.

Tabla 1. Composición de buffers de lisis evaluados

| Buffer | Composición |
|--|--|
| OTTO (Otto, 1990). | OTTO I: Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O (pH 8-9) |
| Se utilizan dos buffers para la extracción de núcleos. | OTTO II: 0.1 M ácido cítrico; 0.5 % Tween 20 |
| LB01 | 15 mM Tris; 0,5 mM espermina tetrahidroclorido; 80mM KCl; 20 mM NaCl; 0.1 % triton X-100. |
| (Doležel <i>et al.</i> , 1989) | 0.2 M Tris. HCl; 4mM MgCl ₂ ; 2 mM EDTA; 80 mM NaCl; 10 mM metabisulfito de Na; 1 % PVP; 1 % Triton X-100 |
| (Loureiro, Rodríguez, Doležel. y Santos, 2006) | |
| (Lutz, Wang, Zdepski y Michael, 2011) | 0.4 M sacarosa; 10mM Tris pH 8; 10 mM MgCl ₂ ; 5mM B-mercaptoetanol. |

La estimación del tamaño de ADN en cantidades absolutas (picogramos) fue obtenida de acuerdo con Doležel (2005), comparando los valores promedio de los picos de fluorescencia G0/G1

correspondientes a la muestra de referencia (tomate) y la muestra de melina en la cual el contenido de ADN corresponde al valor 2C. El cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

Valor 2C de la muestra (pg o Mpb de ADN)

$$= \text{Valor de referencia 2C} \times \frac{\text{Posición media del pico 2C de la muestra}}{\text{Posición media del pico 2C de referencia}}$$

RESULTADOS

Aislamiento de núcleos y selección de la especie de referencia

Se evaluaron cuatro buffers distintos para la extracción de núcleos (tabla 1). En la mayoría de las suspensiones se encontró gran cantidad de detrito

en las muestras de melina, comparado con las referencias; aun así, en todos los casos se lograron obtener núcleos. Sin embargo, el buffer LB01 fue el que permitió obtener los núcleos de melina más definidos, lo que reflejó una mejor integridad en los mismos. Este buffer también fue apropiado para la extracción de núcleos de las diferentes especies empleadas como estándares (figura 1).

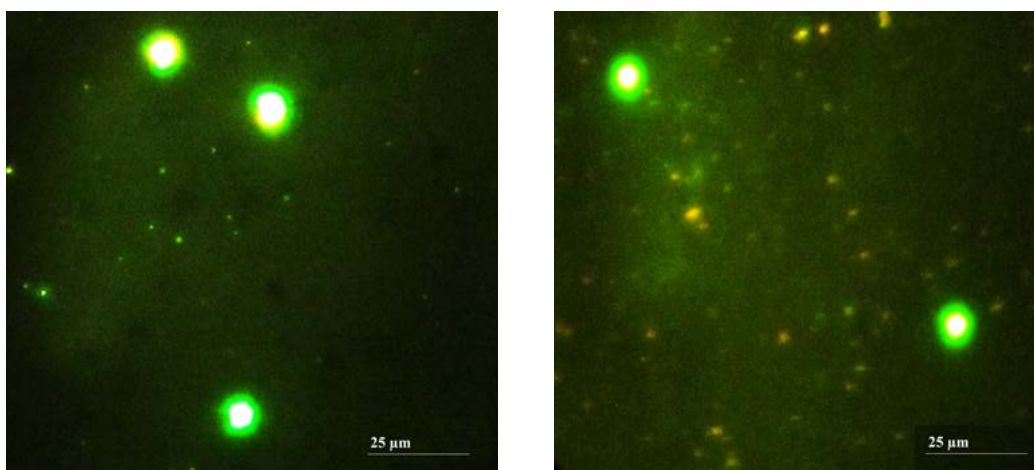


Figura 1. Núcleos de a) *Glycine max* (soya) y b) *Gmelina arborea* (melina) obtenidos mediante el uso del buffer de extracción LB01. Los núcleos fueron teñidos con PicoGreen y diluidos en una relación 1/50 en buffer para evaluar su integridad mediante microscopía de fluorescencia (aumento 200X).

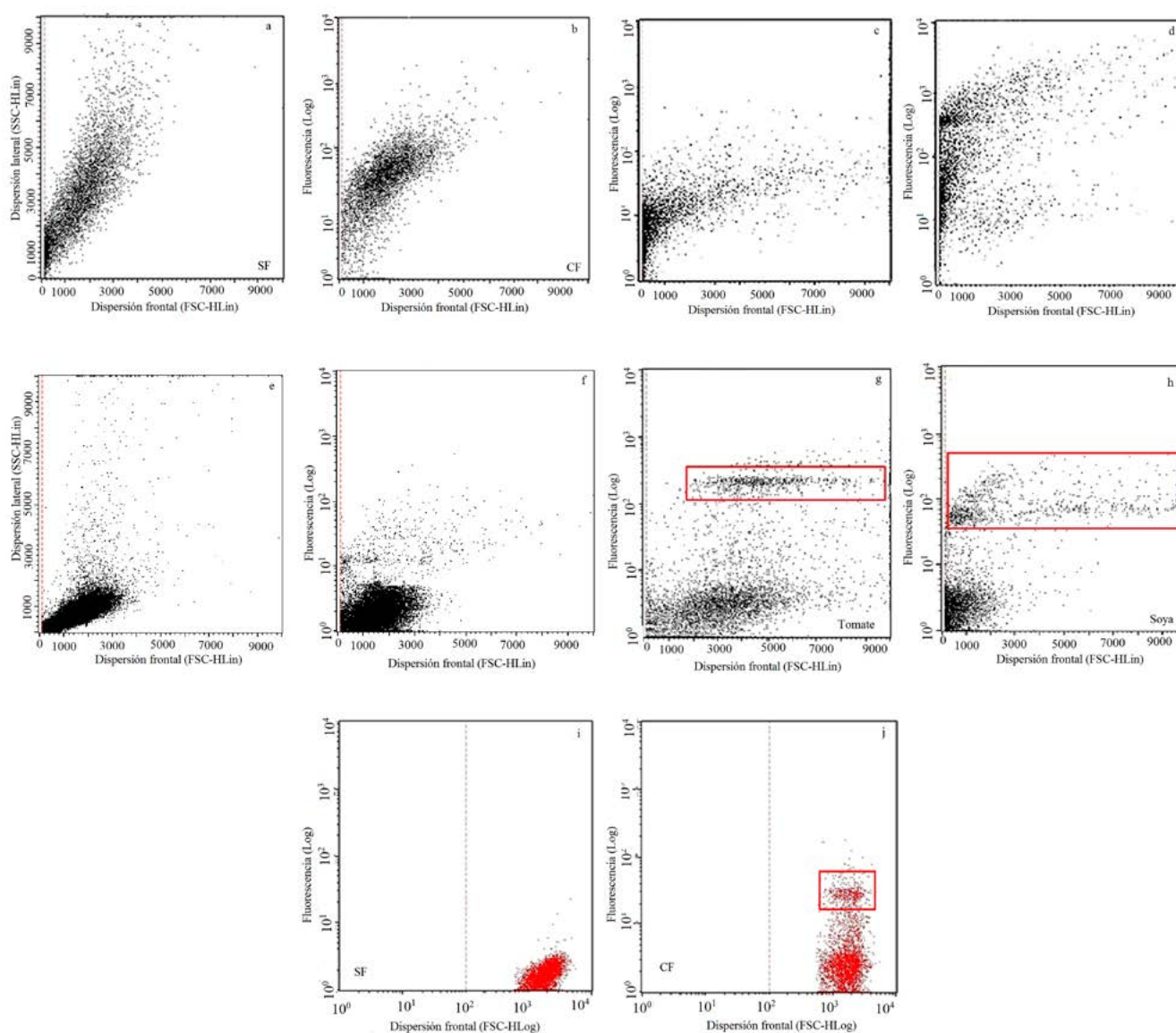


Figura 2. Gráficos de dispersión de la población de núcleos de diferentes especies vegetales de acuerdo con el tipo de buffer de extracción empleado. a) Buffer OTTO con muestra de melina sin fluorescencia, SF) y b) con fluorescencia, CF; c) Buffer Lutz con muestra de melina sin fluorescencia y d) con fluorescencia; e) Buffer Loureiro con muestras de melina sin fluorescencia y f) con fluorescencia; g) Buffer LB01 con muestra de núcleos de tomate y h) de soya, ambas analizadas con fluorescencia; i) Muestra de melina con buffer LB01 sin agente fluorescente y j) con agente fluorescente. En los recuadros se denotan las poblaciones de núcleos intactos correspondientes a los picos de fluorescencia emitida.

Al observar la dispersión de las poblaciones de núcleos obtenidas con los buffers OTTO, Loureiro y Lutz, mediante citometría de flujo, se corroboró la presencia de una gran cantidad de detrito evidenciada por una población heterogénea de partículas con tamaños reducidos, acompañada de una ausencia de subpoblación de partículas diferenciadas al añadir el agente fluorescente (figuras 2a-2f). Lo anterior generó una baja o nula definición de los picos de fluorescencia asociados a núcleos presuntivos.

Sin embargo, al utilizar el buffer LB01, se obtuvieron poblaciones de núcleos diferenciadas de la

población de partículas no teñidas (detrito) y a su vez, una menor cantidad de detrito tanto en muestras provenientes de especies de referencia como de melina (figuras 2g-2j). Por lo cual, este buffer fue seleccionado para el aislamiento de núcleos en todas las especies analizadas.

Se analizaron los valores de intensidad de fluorescencia de las poblaciones de núcleos obtenidos a partir de las suspensiones de soya, rábano y tomate utilizando el buffer LB01. En el caso de tomate y soya se observaron los picos G0/G1 con intensidades promedio de fluorescencia cercanas a

Tabla 2. Valor promedio de fluorescencia de núcleos y coeficiente de variación para las diferentes especies evaluadas

| Especie | Valor promedio de fluorescencia pico G0/G1 | Coefficiente de variación (%) |
|-----------------------------|--|-------------------------------|
| <i>Glycine max</i> | 60 ± 2.085 | 3.4 |
| <i>Raphanus sativus</i> | 110 ± 2.10 | 1.9 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | 189.2 ± 1.41 | 0.7 |
| <i>Gmelina arborea</i> | 92.35 ± 0.44 | 0.47 |

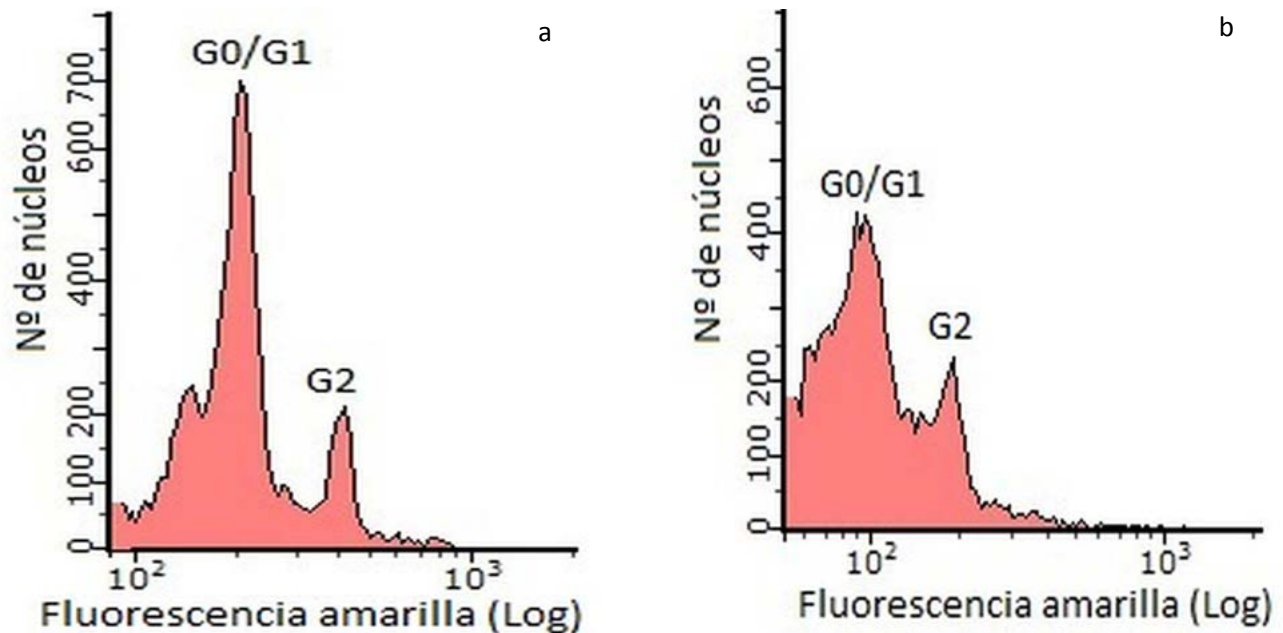


Figura 3. Histogramas de fluorescencia de poblaciones de núcleos provenientes de poblaciones de: a) tomate (*Solanum lycopersicum*) y b) melina (*Gmelina arborea*). Se indican los picos correspondientes a las poblaciones de núcleos en fase G0/G1. Los valores de fluorescencia se encuentran en escala logarítmica.

189 y 60, respectivamente (tabla 2). Sin embargo, en el caso de soya la intensidad de fluorescencia no coincidió con los intervalos de fluorescencia reportados para esta especie (Doležel *et al.*, 1994), y no arrojó un valor de fluorescencia superior al de tomate como era lo esperado según su mayor valor C. Por tal motivo, este indicador no fue empleado como referente.

En el caso de rábano los picos se definieron mejor y se observó que el pico G0/G1 (valor promedio de fluorescencia 110) estaba muy cercano al pico de melina; en el caso de tomate el pico G0/G1 se definió claramente con un valor promedio de 189.2 (tabla 2). En cuanto a melina el análisis dio un promedio de fluorescencia del pico G0/G1 de 92.35, lográndose observar un pequeño pico correspondiente a núcleos en fase G2 (figura 3).

Estimación del valor C en *Gmelina arborea*

Para la estimación del valor 2C en *G. arborea* se utilizaron las intensidades medias de fluorescencia del estándar de tomate y de melina, así como el valor 2C reportado para tomate, (1.96 pg de acuerdo con Doležel, 2005).

$$\text{Valor 2C (pg)} = 1.96 \times (92.35/189.20) = 0.95$$

$$\text{Valor C (pg)} = 0.48$$

Con el fin de corroborar este resultado se calculó el valor 2C de rábano empleando como referencia el tomate. El valor 2C de rábano obtenido aplicando la fórmula fue de 1.14 pg, valor que difiere muy poco con respecto al teórico (1.11 pg, error del 2.6 %). Si bien el rábano arrojó un mayor coeficiente de variación en la lectura de fluorescencia, comparado con el tomate (tabla 2), se calculó de igual manera el valor 2C de melina empleando como referencia el rábano (2C = 1.11 pg, con una fluorescencia de 110), lo que arrojó un valor 2C para melina de 0.93 pg, lo que equivale a un valor C de 0.47 pg (455.70 Mpb).

Teniendo en cuenta los valores obtenidos con las dos especies empleadas como estándares (tomate y rábano), tanto el valor 2C, como el tamaño de genoma de melina se estimaron como promedios de los valores obtenidos por medio de cada referencia: valor C (melina) = 0.47 pg, equivalente a un tamaño de genoma haploide de 461.60 Mpb.

DISCUSIÓN

La utilidad de la citometría de flujo en la estimación del contenido de ADN ha sido evidenciada en diferentes especies. Sin embargo, varios factores como la selección del buffer adecuado, el grado de maceración del tejido o características propias del tejido vegetal, como la ubicación dentro de la hoja, la presencia de metabolitos secundarios o sustancias mucilaginosas, afectan el éxito en su estimación (Srisawat, Pattanapanyasat y Doležel, 2012; Wang, Liu y Kang, 2015). Adicionalmente, Jedrzejczyk y Sliwinska (2010) indican que, en el caso de especies leñosas, es común la presencia de inhibidores que pueden interferir en una adecuada tinción de los núcleos.

La selección de un buffer de extracción adecuado es clave para la obtención de suspensiones con núcleos intactos y baja cantidad de detrito (Loureiro *et al.*, 2007). Por lo cual, para la normalización del proceso de extracción de núcleos, se evaluaron distintos buffers reportados comúnmente en la literatura. A pesar de ello, para la mayoría de especies evaluadas (melina y especies de referencia empleadas como estándares), se encontró una gran cantidad de detrito y un alto coeficiente de variación, por lo cual se seleccionó al buffer LB01 como el más adecuado para la estimación del valor C en melina.

La selección de la especie de referencia también es relevante para una adecuada estimación del tamaño del genoma de la especie de interés. Para verificar la utilidad de las especies evaluadas, así como para determinar los mejores estándares a emplear con respecto a la especie de estudio,

es necesario contar con más de dos o tres indicadores con valores C diferentes, con el fin de verificar la correspondencia entre las intensidades de fluorescencia y los valores 2C reportados en la literatura. Esta verificación, basada en una comparación entre estándares, permitió descartar uno de los tres empleados (soya) en el análisis, debido a que los datos no fueron coherentes ni con respecto a los otros dos, ni con la teoría o literatura; probablemente, este resultado está relacionado con la menor calidad de las suspensiones nucleares obtenidas, representada por un mayor coeficiente de variación entre todos los estándares evaluados (tabla 2). Adicional a lo anterior, de acuerdo con Doležel (2007), para una mejor determinación del valor C de una especie desconocida, la especie de referencia empleada como estándar debe contener un valor C cercano al de la especie de interés, evitando que sea demasiado cercano como para observar picos solapados en los histogramas de fluorescencia. Con base en estos criterios, rábano y tomate fueron las especies de referencia con un valor C más cercano al de melina; sin embargo, en el caso de rábano, el pico G0/G1 solapaba con el de melina, y para el caso del tomate, el pico G2 solapaba parcialmente con el G0/G1 de melina. Con lo cual, no fue posible realizar un análisis empleando los núcleos de la especie de referencia interna, en la misma corrida de citometría de la muestra problema (núcleos de ambas especies mezclados), algo que permite una menor fuente de variación debido a posibles diferencias entre corridas o entre tinciones independientes.

Doležel *et al.* (2007) y Greilhuber (2008) indican además que son deseables coeficientes de variación menores al 5 % en los valores de intensidad de fluorescencia de los picos G0/G1. En el caso de melina se determinó un coeficiente de variación de 0.75 %, y en el caso de los estándares empleados fueron de 0.7 y 1.9 % para tomate y rábano respectivamente: todos inferiores al 5 %; con lo cual se infiere una alta confiabilidad en los resultados obtenidos, si bien el error estimado en la determinación del valor C y tamaño de genoma

para melina a través de los dos métodos empleados fue del 2.6 %.

De acuerdo con las categorías establecidas por Leitch (1998), el genoma de melina se ubica dentro de las especies con genoma muy pequeño ($2C < 1.4$ pg). Al comparar el valor C estimado para melina con el de otras especies vegetales, este es aproximadamente tres veces mayor que el de *Arabidopsis thaliana* (Leitch *et al.*, 2019), pero bastante cercano al de *Populus trichocarpa*, la especie forestal modelo (0.49 pg) (Tuskan *et al.*, 2006). Con respecto a la familia (Lamiaceae), este valor es muy cercano al reportado para otra especie maderable tropical de gran importancia económica: la teca *Tectona grandis*, con un valor C de 0.48 pg equivalentes a 465 Mpb (Ohri y Kumar, 1986). Con relación a otras especies de la misma familia, el valor es cercano al de *Salvia* sp y *Melitis* sp; sin embargo, para la misma familia los valores C varían de 0.28 hasta 6.24 pg (Leitch *et al.*, 2019).

De acuerdo con Loureiro *et al.* (2006), los cambios en los valores C en el mismo taxa pueden estar relacionados con distintos niveles de ploídia y números cromosómicos. En el caso de melina se han reportado diferentes números cromosómicos $2n=38, 40$ (Prota, 2016), lo cual, además del genotipo, podría generar pequeños cambios en el valor C estimado. Adicionalmente, los valores pueden cambiar de acuerdo con el tipo de agente de tinción utilizado; al respecto, Bourge *et al.* (2018) indican que los agentes intercalantes simples como el yoduro de propidio son poco sensibles a la composición de bases, lo cual puede generar diferencias en las estimaciones con respecto a otros agentes.

Si bien no existe una relación directa entre tamaño de genoma y número de genes en organismos eucariotas y en particular en plantas (pues la expansión de tamaño de los genomas se relaciona más con la acumulación de secuencias repetitivas dispersas, la mayoría no génicas, como por ejemplo los transposones o elementos transponibles), es posible acercarse a una estimación basada en el conocimiento existente de genomas de especies modelo con genoma secuenciado. Así,

basado en que la planta modelo *A. thaliana* tiene un tamaño de genoma de 135.6 Mpb y cerca de 27600 genes codificantes y 6500 no codificantes, y el árbol modelo *P. trichocarpa* tiene un tamaño de genoma de 423 Mbp, 41 300 genes codificantes y 1012 genes no codificantes (Hunt *et al.*, 2018), queda evidente que no existe una relación directa entre tamaño y número de genes, independientemente del tipo de genes (codificantes o no). A pesar de estas discrepancias, en el estudio de Elliot y Gregory (2015) se encontró una moderada correlación positiva entre el número de genes que codifican proteínas y el tamaño del genoma en especies eucariontes. Teniendo en cuenta esta posible correlación y que en especies similares de la misma familia de melina como *Tectona grandis*, cuyo tamaño haploide de genoma fue estimado en 0.48 pg utilizando citometría de flujo (Ohri y Kumar, 1986), y cuyo número de genes fue estimado por secuenciación en 36 172 genes (Yasodha *et al.*, 2018). Probablemente en el caso de *G. arborea* el valor se encuentre en un intervalo de 35 000 a 40 000 genes; no obstante, son necesarios nuevos estudios, que empleen aproximaciones de genómica estructural y funcional, que permitan definir con claridad el número de genes presentes en el genoma de melina.

CONCLUSIÓN

Con el protocolo utilizado se determinó un valor C de 0.47 pg equivalente a un tamaño de genoma haploide de 467 Mpb para *Gmelina arborea*; es posible que este valor pueda cambiar de acuerdo con el genotipo y a la variación en el número cromosómico $2n$ de la especie. Sin embargo, esta primera estimación puede ser útil como base para nuevas investigaciones complementarias que permitan validar el valor encontrado, o destinadas a evaluar variaciones del mismo en la población, así como para otras áreas de aplicación biotecnológica o de mejoramiento genético en esta importante especie forestal.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la compañía Pizano S.A., especialmente a Miguel Rodríguez por el aporte del material vegetal de *Gmelina arborea*, al doctor Jaroslav Doležel del Instituto experimental de Botánica de la República Checa, por proporcionar las semillas de las especies utilizadas como referentes.

ML Yaya-Lancheros fue beneficiaria de una beca de Colciencias que financió sus estudios doctorales en el marco de los cuales se realizó esta investigación. Los autores agradecen igualmente, al doctor Ismael Samudio, exintegrante del Laboratorio de Bioquímica de la Pontificia Universidad Javeriana, por su asesoría y orientación con los análisis citométricos realizados en su laboratorio.

Esta investigación fue financiada con recursos de los proyectos de investigación de la Vicerrectoría de Investigación de la Pontificia Universidad Javeriana con ID 4550 y 5654.

CONFLICTOS DE INTERÉS

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

CONTRIBUCIÓN POR AUTOR

W.T y M. Y-L, idearon la investigación; M. Y-L realizó los experimentos en laboratorio. Ambos autores analizaron los datos y redactaron el manuscrito, así como también contribuyeron a la discusión y comentaron los borradores.

REFERENCIAS

- Aliyu, O. (2012). Development of the flow cytometric protocol for ploidy analysis and determination of relative nuclear DNA content in cashew (*Anacardium occidentale* Linn.). *American Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2(4), 200-215.
<https://doi.org/10.3923/ajbmb.2012.200.215>

- Bennett, M. D.** (2005). Nuclear DNA Amounts in Angiosperms: Progress, Problems and Prospects. *Annals of Botany*, 95(1), 45-90.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci003>
- Bourge, M., Brown, S. C. y Siljak-yakovlev, S.** (2018). Flow cytometry as tool in plant sciences, with emphasis on genome size and ploidy level assessment. *Genetics & Applications*, 2(2), 1-12.
<https://doi.org/10.31383/ga.vol2iss2pp1-12>
- Doležel, J.** (2005). Plant DNA Flow Cytometry and Estimation of Nuclear Genome Size. *Annals of Botany*, 95(1), 99-110.
<https://doi.org/10.1093/aob/mci005>
- Doležel, J., Binarová, P. y Lucretti, S.** (1989). Analysis of Nuclear DNA content in plant cells by Flow cytometry. *Biologia Plantarum*, 31(2), 113-120.
<https://doi.org/10.1007/BF02907241>
- Doležel, J., Doleželová, M. y Novák, F. J.** (1994). Flow cytometric estimation of nuclear DNA amount in diploid bananas (*Musa acuminata* and *M. balbisiana*). *Biologia Plantarum*, 36(3), 351-357.
<https://doi.org/10.1007/BF02920930>
- Doležel, J. y Greilhuber, J.** (2010). Nuclear genome size: Are we getting closer? *Cytometry*, 77(7), 635-42.
<https://doi.org/10.1002/cyto.a.20915>
- Doležel, J., Greilhuber, J. y Suda, J.** (2007). Estimation of nuclear DNA content in plants using flow cytometry. *Nature Protocols*, 2(9), 2233-2244.
<https://doi.org/10.1038/nprot.2007.310>
- Dvorak, W. S.** (2004). World view of *Gmelina arborea*: opportunities and challenges. *New Forests*, 28(2/3), 111-126.
<https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000040940.32574.22>
- Elliott, T. A. y Gregory, T. R.** (2015). What's in a genome? The C-value enigma and the evolution of eukaryotic genome content. *Philosophical Transactions Royal Society B*, 370(20140331), 1-10.
<https://doi.org/10.1098/rstb.2014.0331>
- González-Rojas, M., Murillo-Cruz, R. y Ávila-Arias, C.** (2016). Crecimiento inicial de *Gmelina arborea* Roxb. aplicando diferentes tratamientos de fertilización en el Pacífico Sur de Costa Rica. *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 13(33), 29-35.
<https://doi.org/10.18845/rfmk.v13i33.2575>
- Greilhuber, J.** (2008). Cytochemistry and C-values: The Less-well-known World of Nuclear DNA Amounts. *Annals of Botany*, 101(6), 791-804.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm250>
- Hunt, S. E., McLaren, W., Gil, L., Thormann, A., Schuilenburg, H., Sheppard, D., Parton, A., Armean, S., Trevanion, S., Flicek, P. y Cunningham, F.** (2018). Ensembl variation resources. *Database*.
<https://doi.org/10.1093/database/bay119>
- Jedrzejczyk, I. y Sliwinska, E.** (2010). Leaves and seeds as materials for flow cytometric estimation of the genome size of 11 rosaceae woody species containing DNA-staining inhibitors. *Journal of Botany*, 1-9.
<http://dx.doi.org/10.1155/2010/930895>
- Leitch, I. J.** (1998). Phylogenetic Analysis of DNA C-values provides Evidence for a Small Ancestral Genome Size in Flowering Plants. *Annals of Botany*, 82, 85-94.
<https://doi.org/10.1006/anbo.1998.0783>
- Leitch, I. J., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O. y Bennett, M. D.** (2019). Plant DNA C-values database (release 7.0). Recuperado de <https://cvalues.science.kew.org/>
- Loureiro, J., Rodríguez, E., Doležel, J. y Santos, C.** (2006). Comparison of Four Nuclear Isolation Buffers for Plant DNA Flow Cytometry. *Annals of Botany*, 98(3), 679-689.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcl141>
- Loureiro, J., Rodríguez, E., Doležel, J. y Santos, C.** (2007). Two new nuclear isolation buffers for plant DNA flow cytometry: A test with 37 species. *Annals of Botany*, 100, 875-888.
<https://doi.org/10.1093/aob/mcm152>
- Lutz, K. A., Wang, W., Zdepski, A. y Michael, T. P.** (2011). Isolation and analysis of high quality nuclear DNA with reduced organellar DNA for plant genome sequencing and resequencing. *BMC Biotechnology*, 11(54), 1-9.
<https://doi.org/10.1186/1472-6750-11-54>
- Moya, R. y Tomazello, F. M.** (2006). Variation in the wood anatomical structure of *Gmelina arborea* (Verbenaceae) trees at different ecological conditions in Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 56(2), 689-704.

- Ohri, D. y Kumar, A.** (1986). Nuclear DNA Amounts in Some Tropical Hardwoods. *Caryologia*, 39(3-4), 303-307.
<https://doi.org/10.1080/00087114.1986.10797792>
- Otto, F.** (1990). DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. *Methods in Cell Biology*, 33, 105-110.
[https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60516-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60516-6)
- Pellicer, J., Hidalgo, O., Dodsworth, S. y Leitch, I. J.** (2018). Genome Size Diversity and Its Impact on the Evolution of Land Plants. *Genes (Basel)*, 9(2), 1-14.
<https://doi.org/10.3390/genes9020088>
- Prota** (2016). PROTA4U, Plant Resources of Tropical Africa: web database. Recuperado de <https://www.prota4u.org/database/>
- Rojas, A., Moreno, L., Melgarejo, L. M. y Rodríguez, M.** (2012). Physiological response of *Gmelina arborea* Roxb. to hydric conditions of the Colombian Caribbean. *Agronomía Colombiana*, 30(1), 52-58.
- Sliwinska, E.** (2018). Flow cytometry-a modern method for exploring genome size and nuclear DNA synthesis in horticultural and medicinal plant species. *Folia Horticulturae*, 30(1), 103-128.
<https://doi.org/10.2478/fhort-2018-0011>
- Srisawat, T., Pattanapanyasat, K. y Doležel, J.** (2012). Flow cytometric classification of oil palm cultivars. *African Journal of Biotechnology*, 11(16), 3714-24.
<https://doi.org/10.5897/AJB11.2958>
- Tenorio, C., Moya, R., Arias-Aguilar, D. y Briceño-Elizondo, E.** (2016). Biomass yield and energy potential of short-rotation energy plantations of *Gmelina arborea* one-year-old in Costa Rica. *Industrial Crops and Products*, 82, 63-73.
<https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.12.005>
- Tuskan, G., DiFazio, S., Jansson, S., Bohlmann, J., Grigoriev, I., Hellsten, U. y Putnam, N.** (2006). The genome of black cottonwood, *Populus trichocarpa* (Torr. & Gray). *Science*, 313(5793), 1596-1604.
<https://doi.org/10.1016/10.1126/science.1128691>
- Urrego, J. B.** (2004). Growth potential of *Gmelina arborea* at 3 years of age in Colombia. *New Forests*, 28(2/3), 269-276.
<https://doi.org/10.1023/B:NEFO.0000040953.91091.69>
- Vrána, J., Cápál, P., Bednářová, M. y Doležel, J.** (2014). Flow Cytometry in Plant Research: A Success Story. En P. Nick y Z. Opatrný (eds.), *Applied Plant Cell Biology: Cellular tools and approaches for plant biotechnology* (pp. 395-430). Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg Press.
- Yasodha, R., Vasudeva, R., Balakrishnan, S., Sakthi, A. R., Abel, N., Binai, N., Kumar, V., Bachpai, W., Pillai, C. y Dev, S. A.** (2018). Draft genome of a high value tropical timber tree, Teak (*Tectona grandis* L. f): insights into SSR diversity, phylogeny and conservation. *DNA Research*, 25(4), 409-419.
<https://doi.org/10.1093/dnares/dsy013>
- Wang, J., Liu, J. y Kang, M.** (2015). Quantitative testing of the methodology for genome size estimation in plants using flow cytometry: a case study of *Primulina* genus. *Frontiers in Plant Science*, 6(354), 1-13.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00354>

