

Artículo de investigación

CARACTERIZACIÓN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE PROGENIES DE *Cordia alliodora* (R. P.) Oken¹

Genetic variability of *Cordia alliodora* (R. & P.) Oken progenies

Palabras clave: Boraginaceae, *Cordia*, ensayo de procedencias y progenies microsátélites, Nogal cafetero, SSR.

Key words: Boraginaceae, *Cordia*, provenance and progeny trial, microsatellites, Nogal cafetero, SSR.

Marta Leonor Marulanda²

Ana María López³

Marcela Uribe⁴

Carlos Mario Ospina⁵

RESUMEN

Cordia alliodora es un árbol muy conocido como productor de madera en zonas tropicales de América Latina y el Caribe, se caracteriza por producir una valiosa madera y presentar crecimiento rápido. En Colombia es frecuente en sistemas agroforestales con café. Esta especie como la mayoría de especies forestales, presenta problemas biológicos para programas de mejoramiento genético como los largos periodos de regeneración y los altos costos de mantener una población a largo plazo. Los programas de selección asistidos con marcadores moleculares han tenido un gran impacto en el mejoramiento genético, debido a que, minimizan los intervalos de regeneración, incrementan la ganancia genética por generación y permiten la evaluación de la información genética esencial para las especies. En el presente trabajo se caracterizaron 60 individuos de *C. alliodora* pertenecientes a los ensayos de procedencias y progenies establecidos en el programa de mejoramiento genético de Cenicafé. La caracterización se realizó a través de marcadores microsátélites, después del desarrollo de una librería genómica enriquecida con microsátélites de la

especie. Finalmente se evaluaron 24 microsátélites específicos de los cuales 20 permitieron detectar 28 loci polimórficos y multialélicos. Estos resultados ofrecen una guía para orientar las políticas de producción sostenible y conservación de esta especie de valiosa madera, así como una herramienta valiosa para la identificación de clones con interés comercial.

ABSTRACT

Cordia alliodora is a well-known wood producer tree of tropical areas of Latin America and Caribbean. It is characterized for producing valuable wood and by its fast growth rate. In Colombia, it is frequent on agro-forestal systems with coffee. This species, like most forest species have biological problems for genetic improvement programs, such as long regeneration periods and high costs for supporting a population in a long term. The molecular assisted markers in plant breeding programs have had a great impact on genetic improvement, due to the fact they minimize their intervals of regeneration, increase the genetic gain by generation and allow the evaluation of the genetic information es-

¹ Proyecto financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia bajo el código 343 derivado del convenio 002 del 2006 y Gobernación de Risaralda.

² Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira. ubioteve@utp.edu.co. Autora para correspondencia.

³ Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira. ubioteve@utp.edu.co

⁴ Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Universidad Tecnológica de Pereira. ubioteve@utp.edu.co

⁵ Centro Nacional de Investigaciones de café (Cenicafé). carlosmario.ospina@cafedecolombia.com

essential for the species. In this work, 60 genotypes of *C. alliodora* were characterized, belonging to the provenance and progenies tests established by the program of genetic improvement of Cenicafé. The characterization was carried out through microsatellite markers, after developing a genomic library enriched with microsatellites of the species. Finally, 24 specific microsatellites were evaluated, 20 of which allowed the detection of 28 polymorphic and multiallelic loci. These results provide a guide for orienting the policies of sustainable production and conservation of this valuable species; also, it provides a useful tool for the identification of clones with commercial interest.

INTRODUCCIÓN

Las plantaciones forestales están desplazando rápidamente la explotación de los bosques naturales del mundo (Gartland *et al.* 2002), el área total en bosques naturales es aproximadamente de 3,9 billones de hectáreas (Bha), lo que representa el 30 % de la superficie de la tierra, y el consumo de madera industrial supera los 1.600 billones de m³ a nivel mundial (Carson *et al.* 2004). Las Naciones Unidas anticipan que para el año 2030 entre el 50 y 75 % de la producción de madera para uso industrial del mundo procederá de plantaciones forestales, Gartland *et al.* (2002) afirman que esta es la mayor oportunidad para la aplicación a gran escala de la biotecnología en especies forestales, investigando sobre las especies de más rápido crecimiento, los árboles de rotación corta y cuales especies serán las más adaptables al trópico, debido a que las plantaciones forestales se han desplazado desde el hemisferio norte a las zonas tropicales y subtropicales a ambos lados del Ecuador (Carson *et al.* 2004).

La especie *Cordia alliodora* (R. & P.) Oken pertenece a la familia Boraginaceae, es un árbol muy conocido como productor de madera en zonas tropicales de América latina y el Caribe. Se caracteriza por ser una especie de porte alto, hermafrodita y de polinización cruzada. Su distribución en el continente americano es muy amplia: va desde México (25° N) a través de Centro y Sur América hasta Bolivia, el sur de Brasil, y el norte de Argentina

(25° S) (Chase *et al.* 1995, Boshier 1995, Boshier *et al.* 1995a, 1995b, Boshier & Henson 1997, Sebbenn *et al.* 2002, 2005, 2007). En Colombia esta especie se encuentra distribuida en los valles interandinos de las tres cordilleras y la Sierra Nevada de Santa Marta, desde el nivel del mar hasta los 1900 msnm, recibiendo varios nombres según la región.

Hasta el momento las actividades de mejoramiento en *Cordia alliodora* han sido realizadas principalmente en Centro América, Colombia y Brasil. En Colombia Cenicafé (2000), se han empleado marcadores moleculares como apoyo al conocimiento de la diversidad genética presente en poblaciones naturales.

Las técnicas de biología molecular y en particular el uso de marcadores moleculares, han permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones entre grupos de interés (Phillips-Mora 1995). Uno de los usos más generalizados de los marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético es la identificación y selección de individuos (O'Malley *et al.* 1996), esto hace la selección más confiable y precisa.

Los estudios en poblaciones de árboles han ido en aumento a partir del desarrollo de los marcadores microsatélites (SSR), gracias a que estos son muy polimórficos y están ampliamente distribuidos en el genoma de especies animales y vegetales (Danyandan *et al.* 1997, Collevatti *et al.* 1999). Los loci microsatélites contienen una secuencia simple (mono, di, tri o tetra) que se repite, el número de repeticiones por microsatélite puede ser altamente variable, y la naturaleza del marcador es codominante (Buso *et al.* 2006). La utilización de los microsatelites en estudios de especies forestales tropicales ha tenido importantes consecuencias para la conservación y uso sostenible de los recursos forestales. Los marcadores microsatélites han sido herramientas importantes para generar información detallada de la diversidad genética y la estructura de la población en especies que probablemente están siendo sobreexplotadas en áreas como la Ama-

zonía, la selva pacífica, los bosques andinos y el cerrado brasileño. Estos datos, a su vez, ayudan en la elaboración de estrategias para la conservación y aprovechamiento forestal sostenible.

Los objetivos del presente trabajo fueron: identificar marcadores (SSR) que permitan un análisis a nivel de individuos en *C. alliodora*, para relacionar marcadores con características morfológicas de interés comercial; desarrollar huellas digitales de las diferentes progenies y árboles élite de *C. alliodora* que permitan su caracterización; y examinar la variación genética entre las progenies de diferentes procedencias.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

En el año 1997 el Centro Nacional de Investigaciones de Café (Cenicafé) seleccionó en el país, 101 árboles “plus” junto con 13 procedencias obtenidas de cuatro países Centroamericanos como base para el programa de selección y mejoramiento genético de especies forestales de interés asociadas al café.

Los criterios de selección de estos árboles plus se basaron en las características fenotípicas que están bajo el mayor control genético aditivo posible, tales como: Fuste cilíndrico, recto, libre de rajaduras, sin acanalamientos, sin aletones, ni bifurcaciones. Copa pequeña, angosta y simétrica. Ramas delgadas y distribuidas asimétricamente en verticilos separados. Vigor y dominancia sobre los demás individuos de la población y libre de plagas y enfermedades.

De estos 101 individuos se seleccionaron 60 individuos para el presente estudio que arrojaron los mejores resultados de las evaluaciones morfológicas dispuestos en ensayo de procedencias y progenies a lo largo del país. Así mismo, se muestrearon individuos procedentes de huertos clonales. De los individuos seleccionados se colectaron hojas jóvenes y sanas. Las muestras de hojas se colectaron y almacenaron en bolsas herméticas con gel de sílice (Proporción 1:10, tejido vegetal: gel de sílice), posteriormente se transportaron al Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira. En la tabla 1 se describen los códigos y las procedencias de los árboles estudiados.

Tabla 1. Muestras de *Cordia alliodora*, colectadas en los Ensayos de Procedencias y Progenies de CENICAFE.

Código	Población	Sitio de colecta	Ensayo
NSV 3-3-Chinchiná	Norte De Santander	Chinchiná	Procedencias y progenies
NSV 3-4-Chinchiná	Norte De Santander	Chinchiná	Procedencias y progenies
NS-V-3-3-Chinchiná	Norte De Santander	Chinchiná	Procedencias y progenies
CU-I-1-8-Fredonia	Cundinamarca	Fredonia	Procedencias y progenies
T-I-1-3-Paraguacito	Tolima	Paraguacito	Procedencias y progenies
TI 1-1-Paraguacito	Tolima	Paraguacito	Procedencias y progenies
T-I-1-2-Chinchiná	Tolima	Chinchiná	Procedencias y progenies
A-IV-1-1-Chinchiná	Antioquia	Chinchiná	Procedencias y progenies
A-IV-1-1-Darién	Antioquia	Darién	Huerto clonal
A-IV-1-2-Chinchiná	Antioquia	Chinchiná	Procedencias y progenies
A-IV-1-1-Chinchiná	Antioquia	Chinchiná	Procedencias y progenies
A-I-2-3-Paraguacito	Antioquia	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-VI-1-4-Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R-IV-1-2-Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
V-I-1-1-Paraguacito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-III-3-2-Paraguacito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies

Código	Población	Sitio de colecta	Ensayo
R-I-1-5- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-I-2-3- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-III-1-6- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-IV-1-4- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-I-1-3- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
V-I-1-3- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-I-4-1- Paraguaicito	Risaralda	Paraguacito	Procedencias y progenies
R-I-4-2-Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-I-9-1- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-V-1-5- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-I-1-1- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-IV-1-2- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-III-3-1- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-I-7-1- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R -III-2-5- Darien	Risaralda	Caldas	Huerto clonal
R-I-1-4- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-1-1-10- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-IV-1-3- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-I-2-2- Darien	Risaralda	Darién	Huerto clonal
R-I-2-2-Cesar	Risaralda	Cesar	Procedencias y progenies
R-I-1-3- Cesar	Risaralda	Cesar	Procedencias y progenies
R-III-3-1- Fredonia	Risaralda	Fredonia	Procedencias y progenies
R-I-1-10-Santander	Risaralda	Santander	Procedencias y progenies
R-I-1-4- Santander	Risaralda	Santander	Procedencias y progenies
R-I-7-1- Santander	Risaralda	Santander	Procedencias y progenies
R-III-2-8-Cesar	Risaralda	Cesar	Procedencias y progenies
R-I-7-1-Líbano	Risaralda	Líbano	Procedencias y progenies
R-II-2-1- Líbano	Risaralda	Líbano	Procedencias y progenies
R-II-1-3-Belén	Risaralda	Belén	Procedencias y progenies
R-I-1-3- Belén	Risaralda	Belén	Procedencias y progenies
R-III-2-8- Belén	Risaralda	Belén	Procedencias y progenies
R-II-2-1- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R-II-1-3- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R -I - 3- 1- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R -VII-2 -2-huila	Risaralda	Huila	Procedencias y progenies
R-I-1-3- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R-II-1-3- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R-IV-1-3- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
R-III-1-10- Chinchiná	Risaralda	Chinchiná	Procedencias y progenies
071/96A- Chinchiná	Centro América	Chinchiná	Procedencias y progenies
BLO7/94A- Belén	Centro América	Belén	Procedencias y progenies
070/96A- Santander	Centro América	Santander	Procedencias y progenies
BL45/64- Chinchiná	Centro América	Chinchiná	Procedencias y progenies
BLO14/94A- Chinchiná	Centro América	Chinchiná	Procedencias y progenies

EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción del ADN se utilizaron dos métodos, el primero con el Kit de extracción de ADN de plantas de QIAGEN DNA easy Plant mini kit® siguiendo las indicaciones del fabricante, el otro método fue el protocolo de extracción de Doyle & Doyle (1990) modificado por Márquez (2003) para la extracción de ADN de *Cordia alliodora*.

DESARROLLO DE LIBRERÍAS ENRIQUECIDAS PARA LA OBTENCIÓN DE MICROSATÉLITES

Para la construcción de la librería enriquecida se siguió el procedimiento descrito por Jones *et al.* (2002). Las secuencias que contenían las zonas microsatélites fueron ensambladas y editadas en Seqman (DNASStar). Finalmente, se diseñaron iniciadores para llevar a cabo la amplificación por PCR, a través del programa DesignerPCR, version 1.03 (Research Genetics, Inc).

AMPLIFICACIÓN DEL ADN

Para la caracterización de las muestras se utilizaron 20 marcadores microsatélites (Tabla 2). Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final 15 µl con 1X de buffer de amplificación (10 mM de Tris HCl, 50 mM de KCl), 200 µM de una mezcla de dNTPs, 2 mM de cloruro de magnesio, 1 µM de cada uno de los primers, 0.5 U de taq polimerasa y 10 ng de ADN genómico. El perfil de amplificación fue de 30 ciclos de 94 °C durante un minuto, un minuto a la temperatura de apareamiento (Tabla 2) y finalmente un minuto a 72 °C, con una extensión final a 72 °C durante 10 minutos. La separación de los productos amplificados se realizó mediante electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6%, corridos en cámara de electroforesis Sequi-Gen de BioRad, a 110W, los geles fueron teñidos con nitrato de plata siguiendo el protocolo de Benbouza *et al.* (2006).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa GENAIX versión 6.2 (Peakell & Smouse 2006). El análisis comprendió la determinación de medidas de variabilidad genética, diversidad y distancia genética. Además se determinó el poder de discriminación de los marcadores utilizados (D) a través de la fórmula de Tessier *et al.* (1999) y la probabilidad de identidad.

EVALUACIÓN DE CARACTERES MORFOLÓGICOS

Los datos morfológicos de los árboles estudiados fueron tomados por el grupo de investigación en forestales de CENICAFE (Ospina *et al.* 2008), las variables cuantificadas fueron: Longitud de la hoja (HL), Ancho de la hoja (HA), Número de ramas por verticilo (NRV), Diámetro de la copa norte sur (DCNS), Diámetro de la copa este oeste (DCEO), Altura (Medida en metros), Diámetro a la altura del pecho (DAP) (Medida en metros), Supervivencia (Medida en porcentaje), Volumen con corteza (VCC), para esto se utilizó la fórmula que se presenta a continuación (Ospina *et al.* 2008): $VCC=0.0193+[0.0000361(DAP^2*Altura)]$.

Se calculó la distancia euclidiana (Smith & Smith 1992) entre cada par de genotipos con los datos morfológicos, con base en la distancia genética de Nei (1972) y se construyó un dendrograma con el método de agrupación UPGMA (media aritmética no ponderada) utilizando el programa NT-Sys. Versión 2.02 (Rohlf 1989).

RESULTADOS

DESARROLLO DE LIBRERÍAS ENRIQUECIDAS

Se identificaron en total 109 secuencias microsatélites las cuales fueron dispuestas en la base de datos pública del National Center for Biotechnology Information (NCBI - GenBank). Los datos fueron enviados directamente a través del programa

Tabla 2. Características de los iniciadores microsatélites de *Cordia alliodora*. A. Número total de alelos; He: Heterocigosidad esperada; Ho: Heterocigosidad observada; PIC: Contenido de información polimórfica; D: Poder de discriminación; F: Índice de fijación de Wright, valores de p (p – value) con 999 permutaciones y * Promedios.

Locus	No. de accesión en GenBank	Motif	Secuencias de iniciadores (5' - 3')	T° de apareamiento (°C)	Locus (gi)	A	He	Ho	PIC	D	F	p-value
CaA3	GU011846	(GT) ₁₃	F-GAAGCAGCTCTTTTACATTTGT R-TAGTGCCACCCAGTATGC	54	1	4	0,392	0,261	0,6823	0,8857	0,273	0,180
CaA5	GU011882	(GC) ₇	F-GCTGATGGTGAATCTGTGAAC R-ATAGGGAGCATACCTACCTG	57	2	4	0,500	1,000	0,3026	0,1830	-0,566	0,299
CaB6	GU011865	(GA) ₁₆	F-GAGTGGAAATGCTCCCTTATC R-ACCGAAATAGTGGATCTGGAC	57	2	10	0,491	0,567	0,7765	0,8527	-0,088	0,218
CaC7	GU011921	(CAA) ₇	F-GGGTCTCATTTGATGATCTC R-CTCTGGAACACGCTTCTC	57	1	7	0,492	0,575	0,7563	0,8687	-0,158	0,2002
CaD9	GU011933	(TGA) ₁₃	F-ITCTCGTACTCTTCGCTCG R-AATCCTCTCATCTCTCG	54	2	7	0,555	0,710	0,4192	0,7319	-0,101	0,218
CaA102	-----	(CA) ₁₄	F-CTTTGGTGTCAATTTAACTG R-CCTTGTGGAGATTGTCAAC	57	1	2	0,271	0,355	0,4863	0,6285	-0,144	0,351
CaA103	GU011835	(CA) ₁₁	F-TGACAAATGACAAATCTCTCATC R-ACCACCACTACTTCTCT	54	2	7	0,334	0,444	0,6068	0,7302	-0,417	0,263
CaA104	GU011894	(CA) ₁₃	F-AITGCTTTCAGTCCATTCG R-AATGGTGTATTTGGATGATCC	54	2	11	0,505	0,674	0,4226	0,7158	-0,272	0,2275
CaA105	GU011876	(CA) ₁₀	F-GTGTCTCCATTCACCTGA R-TGTTCTGGCTTCGGTAAAG	54	2	10	0,601	0,881	0,6602	0,6280	-0,587	0,2665
CaB101	GU011904	(CT) ₁₄	F-AGTTTTCTGGACCATCAC R-GGAGGTGTAAACAGGAGGTT	54	1	4	0,334	0,436	0,4066	0,6	-0,272	0,308
CaB103	GU011942	(CT) ₁₈	F-GGTTTGGATTGTTTTAGC R-CCTTCTCTTGTATGTTGGA	54	1	3	0,449	0,726	0,5328	0,6103	-0,608	0,249
CaB105	GU011826	(GA) ₁₂	F-GAAGCATCTGTTTGAACCTG R-TCCCTAATCAGGATTGATG	54	2	10	0,419	0,481	0,6806	0,8805	-0,200	0,186
CaC103	GU011887	(CAA) ₈	F-GAGCAAGGAACAGACAACTC R-ACCCACTTGGTGAATTTAC	54	2	10	0,516	0,995	0,5792	0,48	-0,848	0,2565
CaC108	GU011841	(CAA) ₈	F-TAATGGAAACGACAAATGTG R-TGGGAACAACCTCTCTACC	54	1	5	0,418	0,679	0,7074	0,7279	-0,613	0,152
CaB102	GU011874	(CT) ₃₃	F-GTGACGAGAAACGCAACTT R-CTTCCAAAAGACTTGCCATAC	57	1	10	0,572	0,730	0,8843	0,9375	-0,324	0,161
CaD103	GU011925	(TA) ₈ (GT) ₅	F-AGGTTGACCTTACAAATCTGA R-TGCCAATTAAGTCACTTCC	54	1	10	0,627	0,988	0,7508	0,8786	-0,623	0,209
CaB1	GU011868	(GA) ₁₆	F-AATCCCAACATTTACCTATG R-CTTTTCTCCCTCATTTGTTG	57	1	2	0,478	0,649	0,4980	0,6817	-0,355	0,337
CaD1	GU011872	(CAT) ₁₁	F-ACCCACATTTGTTCTCC R-TAGGGGAGTAAAGCGTG	54	1	5	0,604	0,756	0,6846	0,8322	-0,296	0,283
CaD103a	GU011925	(TCA) ₈	F-ATGCCCTGTACTCTCT R-ATGACCCAGTTGTTCTGA	57	1	2	0,331	0,396	0,3770	0,5732	-0,134	0,236
CaC8	GU011930	(CAA) ₁₁	F-GAGTTCTCTCTGGGTCTCTC R-TCTATTGGAACACAGCTCTCT	57	1	10	0,620	0,959	0,8246	0,9241	-0,606	0,137
									0,6019*	0,7175*		

SEQUIN versión 9.50 diligenció la información pertinente para tal fin. Los números de accesión de las 109 secuencias comprendieron los códigos GU011824 al GU011945.

Estas 109 secuencias permitieron el diseño de 74 iniciadores microsatélites, de estos 24 fueron sintetizados. Finalmente se seleccionaron para esta caracterización 20 iniciadores (Tabla 2) dadas sus características de reproducibilidad, calidad en la amplificación y polimorfismo.

ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Los 20 SSR analizados produjeron amplificación positiva y mostraron polimorfismos en varios alelos, el marcador CaA104 produjo el mayor número de alelos (11), seguido de CaA105, CaB102, CaD103 (Tabla 2); los marcadores que presentaron el menor número de alelos (2) fueron CaB1, CaD103a y CaA102. De acuerdo con la variabilidad genética presente y el elevado multialelismo que se encontró en los 20 microsatélites se detectaron 28 loci polimórficos.

En la figura 1 se observa la distribución de los diferentes alelos detectados en los 28 loci microsatélites. Se obtuvieron los parámetros genéticos como el promedio de alelos por locus (N_a), el número de alelos informativos (N_e) y la heterocigosidad esperada (H_e) en las 6 poblaciones y los 60 individuos. La heterocigosidad esperada (H_e) fue mayor en la población de Risaralda seguida por las poblaciones de Centro América y Antioquia (Figura 1). También se observa la presencia de alelos exclusivos en las poblaciones de Risaralda y en menor número en la población de Norte de Santander, la presencia de alelos con frecuencias iguales o inferiores al 50% (alelos de baja frecuencia) se presentaron en mayor número en las poblaciones de Risaralda y Centro América.

Los parámetros genéticos promedio para todas las poblaciones en todos los loci se observan en la tabla 3. El promedio de alelos por locus osciló entre 1.633 para la población de Cundinamarca y, Centro América 4.70, mientras las demás poblaciones presentaron los siguientes promedios de alelos por locus: Antioquia 2.633, 4.433 para la de Risaralda Norte de Santander 2.867 y Tolima 2.033; el promedio de alelos informativos (N_e) fue de 1.633 para

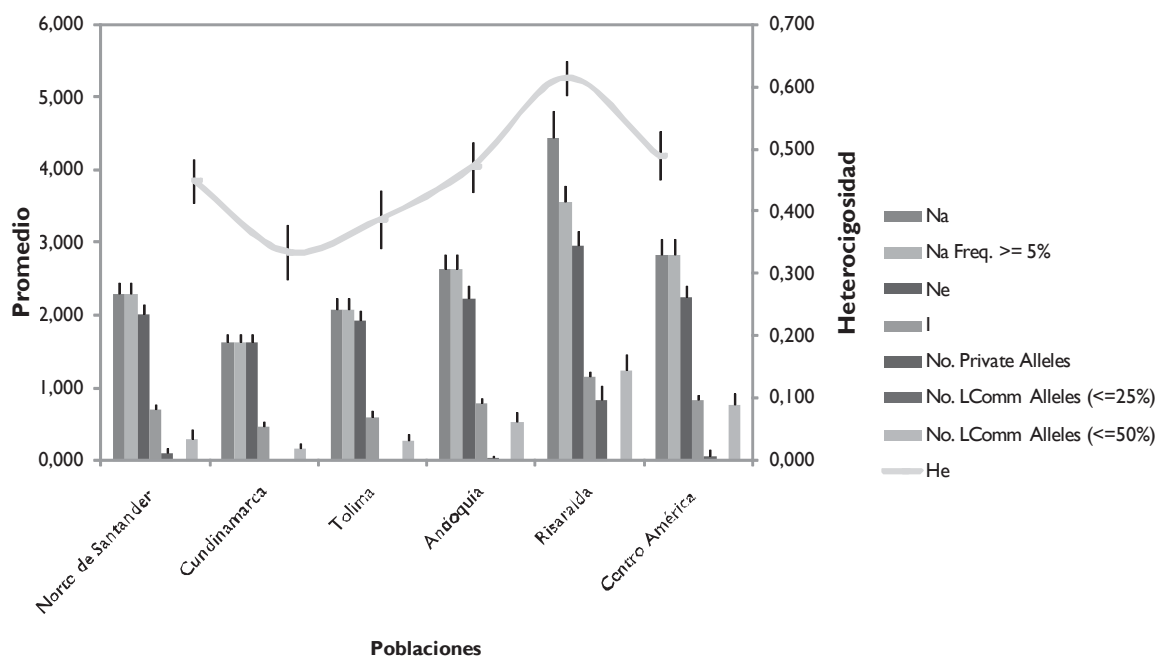


Figura 1. Parámetros genéticos calculados en *Cordia alliodora*: número de alelos por población (N), número de alelos por locus (N_a), alelos más informativos (N_e), heterocigosidad esperada (H_e), Heterocigosidad observada (H_o), índice de fijación (F) y promedio total del coeficiente de endogamia (F_{is}). $N=60$

Tabla 3. Parámetros genéticos calculados en *Cordia alliodora*: número de alelos por población (N), número de alelos por locus (Na), alelos más informativos (Ne), heterocigosidad esperada (He), Heterocigosidad observada (Ho), índice de fijación (F) y promedio total del coeficiente de endogamia (Fis). N=60

Poblaciones	N	Na	Ne	Ho	He	F	p-value	Fis	p-value
Norte de Santander	2.867	2.300	2.020	0.678	0.449	-0.480			
Cundinamarca	0.967	1.633	1.633	0.667	0.333	-1.000			
Tolima	2.033	2.067	1.918	0.639	0.386	-0.665			
Antioquia	4.233	2.633	2.225	0.542	0.471	-0.146			
Risaralda	38.700	4.433	2.954	0.634	0.614	-0.045			
Centro América	4.700	2.833	2.254	0.617	0.489	-0.257			
Promedio Total	8.917	2.650	2.167	0.630	0.457	-0.391	0.043	-0.337	0.143

Cundinamarca y 2.954 para Risaralda, siendo estos los menores y mayores valores respectivamente, los valores de heterocigosidad esperada (He) y observada (Ho) para Risaralda fueron de 0.614 y 0.634 respectivamente, estos fueron los valores más altos respecto a todas las demás poblaciones. El índice de fijación (F) fue -0.045 para el departamento de Risaralda, este fue el valor más alto, siendo el de menor valor el de la población de Cundinamarca (-1.00), todas las poblaciones mostraron valores negativos (Tabla 3). A pesar de que los árboles de *C. alliodora* objeto de esta investigación hacen parte de una población seleccionada para mejoramiento, el valor del índice de fijación (F) para *C. alliodora* estuvo por debajo de 0, mostrando una baja consanguinidad entre los árboles estudiados. Entre tanto, el coeficiente de endogamia (Fis) arrojó un valor promedio de -0.337, Ambos resultados (F y Fis) demuestran que el programa de selección asistida con marcadores moleculares AFLP y RAPD (Marulanda *et al.* 2002, Márquez 2003) que ha apoyado el programa de mejoramiento de CENICAFÉ en el pasado, ha sido muy útil en la selección de los árboles para el establecimiento de los huertos semilleros pues ha permitido seleccionar árboles no emparentados entre sí (Tabla 3).

Los promedios para todas las poblaciones y todos los loci fueron: promedio de alelos por locus (Na) de 2.650; heterocigosidad esperada (He) de 0.457; heterocigosidad observada (Ho) de 0.630;

el índice de fijación (F) fue -0.391 y los alelos informativos (Ne) de 2.167. En el caso de las 20 secuencias SSR de *C. alliodora* evaluadas, 7 fueron secuencias de tri-nucleótidos: CaC7, CaC8, CaD9, CaC108, CaD103a, CaD1 y CaC103, y una pertenece a un microsatélite imperfecto (CaD103). Las 12 secuencias restantes fueron microsatélites dinucleótidos que fueron todos informativos y polimórficos (Tabla 2).

MEDIDAS DE DIVERSIDAD GENÉTICA

Los parámetros de diversidad genética encontrados al analizar 28 loci permitieron identificar poblaciones con baja consanguinidad, marcadores multialélicos y heterocigosidades esperadas iguales a las observadas.

El análisis de varianza molecular (AMOVA) (Tabla 4), reveló que el mayor porcentaje de variación lo aportaron las diferencias al interior de las poblaciones (95 %), seguida de la variación entre poblaciones (5%). Estos datos ratifican que una parte importante

Tabla 4. Datos del análisis de varianza molecular – AMOVA. N=60

FUENTE	gl	Est. Var.	% de variación
Entre poblaciones	4	0,184	5%
Dentro de las poblaciones	54	3,332	95%
Total	58	3,516	100%

Tabla 5. Distancias genéticas pareadas entre poblaciones. N=60

	Norte de Santander	Cundinamarca	Tolima	Antioquia	Risaralda	Centro América
Norte de Santander	0.000					
Cundinamarca	0.359	0.000				
Tolima	0.436	0.377	0.000			
Antioquia	0.279	0.298	0.344	0.000		
Risaralda	0.284	0.297	0.286	0.197	0.000	
Centro América	0.310	0.379	0.447	0.284	0.130	0.000

de la variación va a estar al interior de las poblaciones, y que esta característica unida a datos de alelos exclusivos, distancias genéticas importantes, y la asociación a características morfológicas de interés determinarán la permanencia de los materiales en el programa de mejoramiento genético.

MEDIDAS DE DISTANCIA GENÉTICA

La distancia genética entre individuos se puede evidenciar en la figura 4, donde se forman 5 grupos, todos los grupos presentan individuos risaral-

denses. La distancia genética entre las poblaciones (Tabla 5) indica que las poblaciones con mayores distancias genéticas las presentan las poblaciones de Tolima y Centro América (0.447), y de Tolima con Norte de Santander (0.436), entre tanto, las menores distancias genéticas están entre Risaralda y Centro América (0.130) y Antioquia y Risaralda (0.197).

En el análisis de coordenadas principales, basado en las distancias genéticas entre los individuos, (Figura 2), se observa una mayor cercanía entre

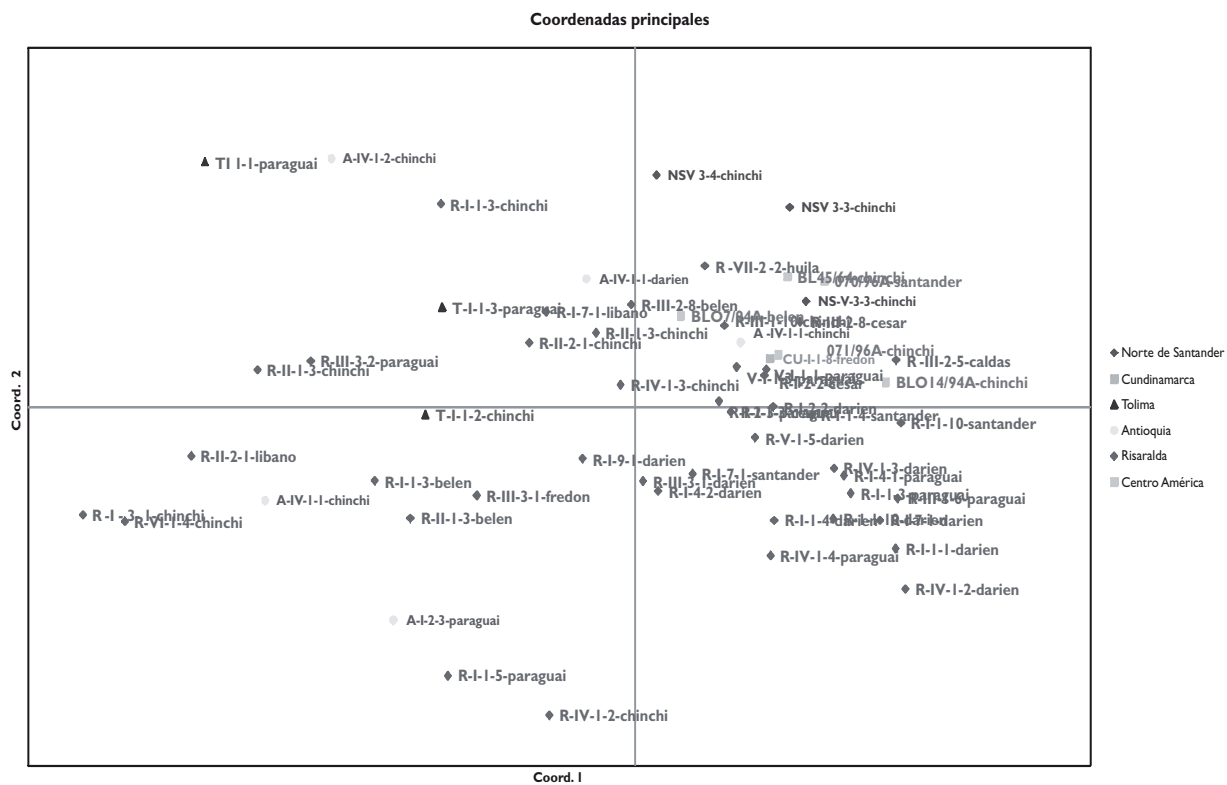


Figura 2. Análisis de coordenadas principales de muestras de *Cordia alliodora*

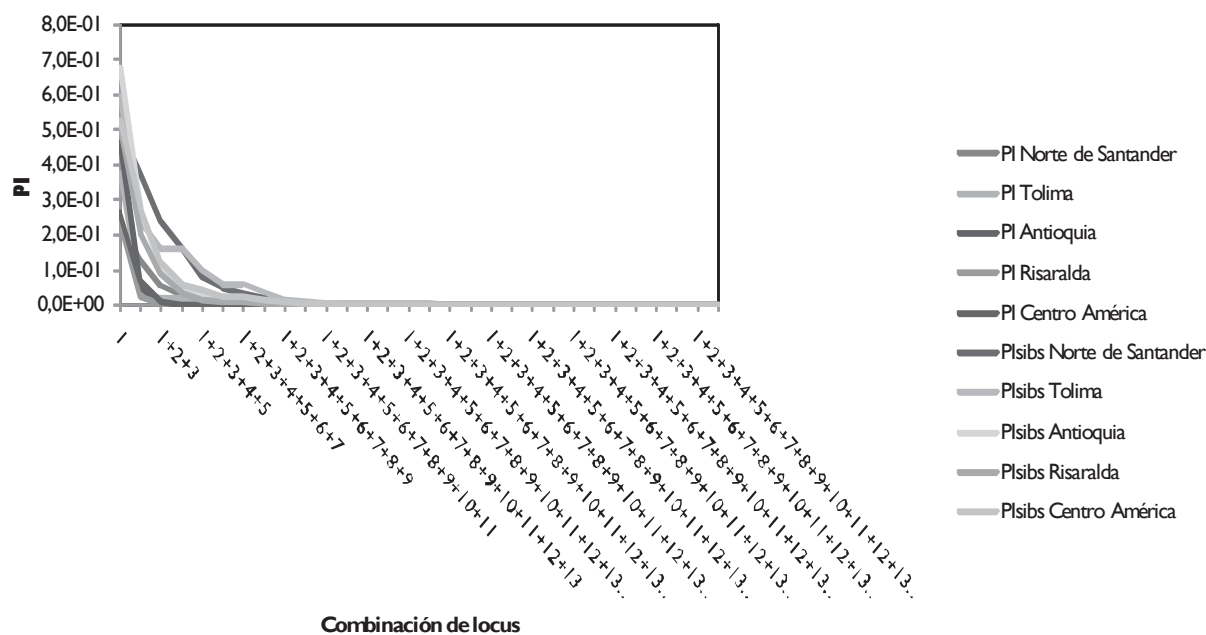


Figura 3. Probabilidad de identidad (PI) de acuerdo a diferentes combinaciones de loci para poblaciones seleccionadas de *Cordia alliodora*.

los materiales risaraldenses y centro americanos. Algunos materiales antioqueños, norte santandereanos y tolimenses se encuentran separados del grupo de individuos risaraldenses y centroamericanos. En el análisis de coordenadas principales la mayor cantidad de individuos se agrupan en el primer y cuarto cuadrante, entre tanto los individuos más separados genéticamente se encuentran en el segundo y tercer cuadrante.

PROBABILIDAD DE IDENTIDAD

En *C. alliodora* la combinación de 12 microsatélites permite la obtención de una probabilidad única para un individuo, la figura 3 muestra como a partir de la combinación de 5 loci, el número de individuos con un genotipo único comienza a aumentar mientras descende el número de individuos con genotipos iguales. La mayor variabilidad de los microsatélites en comparación con otros marcadores aumenta la probabilidad de que cada individuo en una población tenga un genotipo único, haciendo que los microsatélites sean muy útiles en el desa-

rollo de huellas digitales, estudios sobre el flujo de polen o la dispersión de semillas. Estos marcadores son además sensibles a cambios en el tamaño de las poblaciones de mejoramiento, a cambios en la estructura de las poblaciones, así como cambios en las tasas de dispersión (Slatkin 1995).

EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

Las distancias euclidianas agrupadas por UPGMA se observan en un dendrograma (Figura 5) donde se evidencia la formación de tres grupos de similitud. En este dendrograma se observa la formación de un grupo con mayores diferencias respecto al resto de las progenies y está compuesto por: R-III-2-8C; A-IV-1-1C; R-III-2-8-R; R-II-1-3C y 070/96AS, estas progenies se caracterizan por los mayores valores de DAP. El grupo 1 se caracteriza por los genotipos con mayores valores de DAP y altura al mismo tiempo, es decir, los individuos con mejores características forestales (RI- 1-10S, R III-1-10C, RI 1-3R, RI-VI-3C, RI-1-4S, NSV3-3C, BL7/94AR).

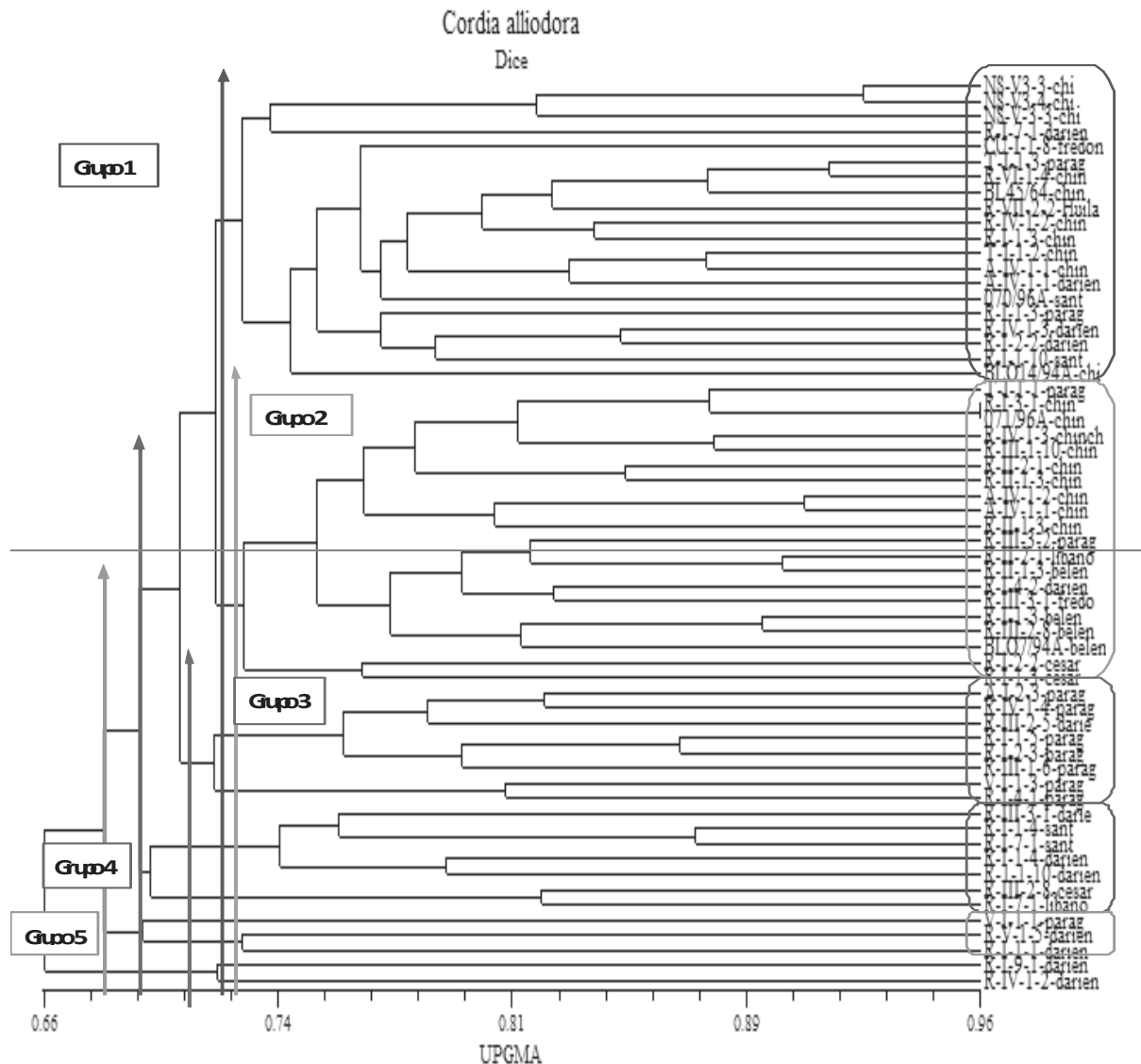


Figura 4. Dendrograma con el índice de similitud de Dice y el método de agrupamiento UPGMA entre individuos de *Cordia alliodora*

DISCUSIÓN

En los análisis de la variabilidad genética los 28 loci obtenidos en *C. alliodora* son altos si se comparan con los obtenidos en otras especies de árboles como: *Quercus myrsinifolia* donde se detectaron 9 loci; *Q. petraea* donde se obtuvieron 17 loci ; en *Shorea curtissii* se obtuvieron 9 loci; en *Symphonia globulifera* se detectaron 3 loci; en *Swietenia humilis* se obtuvieron 13 loci (Isagi & Suhandono 1997, Steinkellner *et al.* 1997, Ujino *et al.* 1998, Aldrich *et al.* 1998, White & Powell 1997a, 1997b).

En otras especies forestales en las cuales se han situado microsatélites en mapas genéticos y se ha descrito el número de loci, estos últimos están muy en concordancia con los obtenidos en el presente estudio de *C. alliodora*, por ejemplo en *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla* donde se obtuvieron 19 loci, en *Pinus radiata* se detectaron 16 loci; en *Pinus taeda* se obtuvieron 11 loci, en *Quercus robur* se obtuvieron 18 loci y en *Acacia mangium* se obtuvieron 30 loci (Echt & Nelson 1997, Brondini *et al.* 1998, Barrenche *et al.* 1998, Butcher *et al.* 1999, Devey *et al.* 1999). Los datos obtenidos con microsatélites indican que, además de ser general-

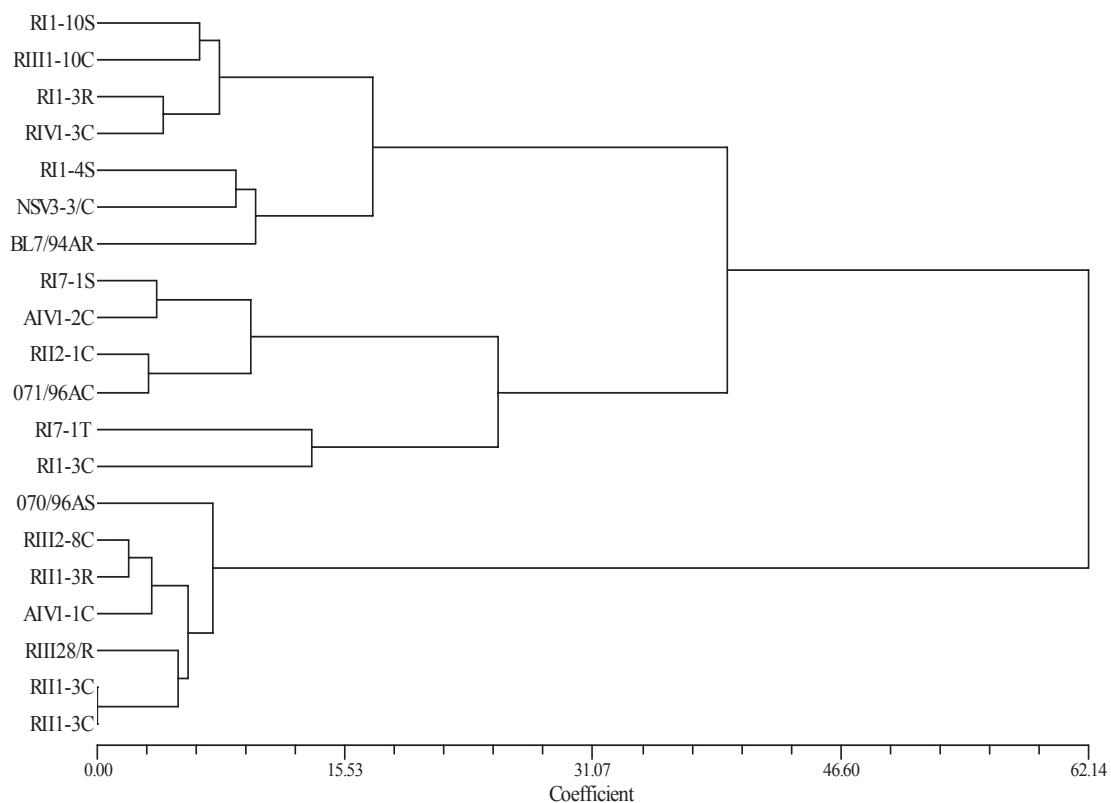


Figura 5. Distancia euclidiana entre progenies de *Cordia alliodora* con datos morfológicos

mente más informativos que otros tipos de marcadores, los loci microsatélites están dispersos por igual en todo el genoma (Butcher *et al.* 1999).

En relación con medidas de diversidad genética Miller & Schaal (2006) analizaron la estructura de las poblaciones naturales y cultivadas de una especie forestal de fruto comestible (*Spondias purpurea*) encontrando que el porcentaje de variación entre poblaciones naturales fue del 35.65% y al interior de las poblaciones del 64.35%, mientras que en materiales cultivados son de 30.19% y 69.81% respectivamente. Estos resultados explican en parte que la mayor variación para *C. alliodora* sea mayor al interior de las poblaciones (95%). Hamrick *et al.* (1979) observaron una notable heterogeneidad al interior de las especies para niveles de variación dentro de las poblaciones. Una proporción significativa de esta variación ha sido asociada con la historia de vida y características ecológicas de las especies. Especies que están ampliamente dispersas, perennes, de polini-

zación cruzada, anemófilas y un alto número de cromosomas están relacionadas con los mayores niveles de variación intrapoblacional.

Las heterocigosidades promedio obtenidas en todos los loci en esta investigación en *C. alliodora* fueron elevadas si se comparan con los trabajos en *Eucalyptus* spp. de Grattapaglia & Kirst (2008) quienes desarrollaron microsatélites con tetra y pentanucleótidos, que les permitieron obtener heterocigosidades por encima de 0.45, estos autores consideran que los perfiles de ADN de los árboles analizados fueron significativamente más robustos, que cuando utilizaron secuencias microsatélites dinucleótidas.

Las medidas de distancia genética muestran alguna agrupación de las progenies respecto a su origen geográfico o procedencia y están en mayor concordancia con los reportados por Boshier *et al.* (1995a) en *C. alliodora* en bosques tropicales en Costa Rica, quienes demostraron que árboles cer-

canos están más relacionados genéticamente en comparación con árboles distantes. En contraste, los resultados obtenidos en esta investigación difieren a los reportados por Marulanda *et al.* (2000) y Márquez (2003) en investigaciones anteriores con genotipos de *C. alliodora* de las mismas procedencias, utilizando marcadores RAPD y AFLP, donde no se encontró agrupación de los genotipos de acuerdo a su origen geográfico. Es importante resaltar que los marcadores microsatélites tienen un mayor poder de resolución, y que la población de árboles analizados es un grupo muy seleccionado en el cual se ha ido reduciendo la base genética, y se han realizado procesos de movilización de semillas de los mejores árboles por parte de los agricultores como lo reportó Márquez (2003). Es importante también tener en cuenta que los estudios de Boshier (1995) y Boshier *et al.* (1995a, 1995b) se realizaron en bosques naturales relativamente bien conservados, mientras los trabajos realizados en Colombia han sido con árboles de relictos de bosques, bosques secundarios y en sistemas agroforestales asociados con café.

Por último la probabilidad de identidad encontrada en el presente estudio arroja una herramienta invaluable para estudios de identificación de clones. Otros investigadores han demostrado el poder discriminatorio de los microsatélites como el caso de Chase *et al.* (1996) con el árbol tropical *Pithecellobium elegans*, pudieron distinguir entre el 80 % de los individuos en una población con sólo tres loci microsatélites comparado con el 37 % de los individuos cuando utilizaron seis loci de isoenzimas (Butcher *et al.* 1999). Se han reportado importantes trabajos con microsatélites en otras especies forestales como en *Q. robur* donde los microsatélites se utilizaron para determinar las relaciones genéticas entre árboles seleccionados (Lefort *et al.* 1998), esto confirma la relevancia de abordar este tipo de investigaciones tal y como se han realizado en el caso de *C. alliodora*. Utilizando nueve loci se estableció que cinco árboles seleccionados no estaban estrechamente relacionados entre ellos, por lo tanto, constituirían una fuente de semillas adecuadas para un programa de mejoramiento avanzado. En

un segundo estudio, nueve loci microsatélites se utilizaron para detectar contaminantes de semillas y confirmar las relaciones de familias de semillas de medios hermanos procedentes de un solo árbol de *Quercus robur* (Lexer *et al.* 1999). Los anteriores son ejemplos de la aplicación práctica de los marcadores microsatélites en programas de selección y mejoramiento en forestales. En el caso de eucalipto la probabilidad de identidad (PI) con seis loci fue menor de 1 en 2000 millones (5×10^{-10}). Los coeficientes de similitud calculados a partir de datos de microsatélites fueron mucho más pequeños, por lo tanto más selectivos, que aquellos obtenidos en estudios similares con RAPD y AFLP (Grattapaglia 2003).

El alto poder de discriminación de los SSR y la aceptación este tipo de tecnología por parte de los mejoradores dió lugar a la inclusión de los marcadores moleculares como descriptores adicionales en los protocolos requeridos para la protección varietal (Brondani & Grattapaglia, 2002; Grattapaglia 2003). La inclusión de marcadores de ADN representó un avance notable en el panorama internacional de protección variedades de árboles forestales, actualmente todas las solicitudes para la protección clonal van acompañados de un perfil de ADN (huella de ADN) multilocus de 15 a 20 microsatélites los cuales se recomiendan basados en varios aspectos tales como robustez, polimorfismo y disponibilidad de los SSR de dominio público. Las perspectivas para los siguientes años es que habrá un número creciente de solicitudes de protección de clones por parte de las empresas forestales en relación con el valor de clones élite de eucalipto manteniendo la competitividad de la industria silvicultora (Brondani & Grattapaglia 2002, Grattapaglia 2003).

CONCLUSIONES

Los árboles de *C. alliodora* objeto de esta investigación y que hacen parte de una población seleccionada presenta índices de fijación de Wright (F) inferiores a cero, demostrando una baja consanguinidad entre los árboles estudiados. Esto demuestra que el programa de mejoramiento de

CENICAFÉ ha establecido huertos semilleros no emparentados entre sí.

En *C. alliodora* a partir de la combinación de 12 microsatélites se obtiene un 100% de los individuos con un genotipo único. Así pues, con los 20 microsatélites descritos en este artículo se entrega una herramienta de identificación clonal y protección varietal para *C. alliodora*.

De las 20 secuencias SSR de *C. alliodora* evaluadas, 7 fueron secuencias de tri-nucleótidos, una pertenece a un microsatélite imperfecto (CaD103), las 12 secuencias restantes fueron microsatélites dinucleótidos, todos mostraron ser informativos y polimórficos.

El análisis de varianza molecular permitió distinguir el gran aporte de los individuos a la variabilidad, superando los aportes que hacen las poblaciones sobre la misma. Es preciso entonces que, aunque el programa de mejoramiento demande la selección de materiales se procure la conservación de materiales en campo y semillas de aquellos que no se seleccionen, esto con el fin de evitar la pérdida de genes y alelos que podrían ser de importancia adaptativa de la especie.

Las caracterizaciones genéticas servirán en un futuro para direccionar polinizaciones controladas entre individuos con características morfológicas adecuadas y de similitudes genéticas bajas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores expresan sus sinceros agradecimientos al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de la República de Colombia, a la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia, a la Gobernación del Risaralda y a la Universidad Tecnológica de Pereira por la financiación de esta investigación. A la Administradora Ambiental y candidata a M. Sc. Juliana Arias Villegas por la administración de este proyecto. A todo el personal del Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Universidad Tecnológica de Pereira por sus valiosos aportes en todo el desarrollo de la presente investigación.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aldrich, P. R., J. L. Hamrick, P. Chavarriaga & G. Kochert.** 1998. Microsatellite analysis of demographic genetic structure in fragmented populations of the tropical tree *Symphonia globulifera*. *Molecular Ecology* 7: 933-944.
- Barreneche, T., C. Bodenes, C. Lexer, J.-F. Trontin, S. Fluch, R. Streiff, C. Plomion, G. Roussel, H. Steinkellner, K. Burg, J.-M. Favre, J. Glossl & A. Kremer.** 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1090-1103.
- Benbouza, H., J. M. Jacquemin, J. P. Baudoin & G. Mergeai.** 2006. Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement* 10 (2): 77-81.
- Boshier, D. H.** 1995. Incompatibility in *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. *Canadian Journal of Botany* 73: 445-456.
- Boshier, D. H., M. R. Chase & M. R. Bawa.** 1995a. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. 2. Mating system. *American Journal of Botany* 82: 476-483.
- Boshier, D. H., M. R. Chase & M. R. Bawa.** 1995b. Population genetics of *Cordia alliodora* (Boraginaceae), a neotropical tree. Gene flow, neighborhood, and population substructure. *American Journal of Botany* 82 (4):484 - 490.
- Boshier, D. H. & M. Henson.** 1997. Genetic variation in *Cordia alliodora*: genetics and tree improvement, pp.: 39-65. En: Boshier, D. H. & A. T. Lamb (eds). *Tropical Forestry Papers* No. 36. Oxford Forestry Institute, Oxford.

- Brondani, R. P. V., C. Brondani, R. Tarchini & D. Grattapaglia.** 1998. Development and mapping of microsatellite based markers in *Eucalyptus*. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 816-829.
- Brondani, R. P. V. & D. Grattapaglia.** 2002. Towards the construction of a genus wide reference linkage map for *Eucalyptus* based on microsatellite markers. *Molecular and General Genetics* 267: 338-347.
- Buso, G. S. C., Z. P. S. Amaral, R. P. V. Brondani & M. E. Ferreira.** 2006. Microsatellite markers for the common bean *Phaseolus vulgaris*. *Molecular Ecology Notes* 6 (1): 252-254.
- Butcher, P. A., J. C. Glaubitz & J. C. Morán.** 1999. Applications for microsatellite markers in the domestication and conservation of forest trees. *Recursos genéticos forestales*. No. 27. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma.
- Carson, M., C. Walter & S. Carson.** 2004. The Future of Forest Biotechnology in: A Challenge Document for Presentation and Discussion at the Workshop Biotecnología Forestal. Global biotechnology forum-march 2 – 5, Concepción.
- Cenicafé -Federación Nacional de Cafeteros de Colombia-. 2000.** Ensayo de procedencias y progenies para dos especies forestales tropicales de alto valor comercial. (Marzo 1996 – Febrero 2000). FEDERACAFE – Min. Ambiente.
- Chase, M., R. Kesseli & K. Bawa.** 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83: 51-57.
- Collevatti, R. G., R. P. Brondani & D. Grattapaglia.** 1999. Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species of *Carycar brasiliense*. *Heredity* 83:748-756.
- Daynandan, S., K. S. Bawa & R. Kesseli.** 1997. Conservation of microsatellites among tropical tree (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84:1658-1663.
- Devey, M. E., M. M. Sewell, T. L. Uren & D. B. Neale.** 1999. Comparative mapping in loblolly and radiata pine using RFLP and microsatellite markers. *Theoretical Applied Genetics* 99:656-662.
- Devey, M.E., J.C. Bell, T.L. Uren, & G.F. Moran.** 2002. A set of microsatellite markers for fingerprinting and breeding applications in *Pinus radiata*. *Genome* 45:
- Doyle, J. J. & J. L. Doyle.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 13-15.
- Echt, C. S. & C. D. Nelson.** 1997. Linkage mapping and genome length in eastern white pine (*Pinus strobus* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 94: 1031-1037.
- Gartland, K. M. A., R.C. Kellison & T.M. Fenning.** 2002. Biotechnology and Europe's Forests of the future. A challenge document for presentation and discussion at Forest Biotechnology Forum in Europe: Impending Barriers, Policy, and Implications. Edinburgh.
- Grattapaglia, D. 2003.** *Genolyptus* pp.: 51-72 En: Borém, A., M. Giudice & T. Sedyama (eds.). *Melhoramento Genômico*. Editora da UFV. Viçosa
- Grattapaglia, D. & M. Kirst.** 2008. *Eucalyptus* applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New Phytologist* 179: 911-929.
- Hamrick, J. L., Y. B. Linhart & Mitton, J. B.** 1979. Relationships between life history characteristics and electrophoretically detectable genetic variation in plants. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*. 10: 173-200.

- Isagi, Y. & S. Suhandono.** 1997. PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia*. Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6: 897-899.
- Jones, E.S., N. L. Mahoney, M. D. Hayward, I.P. Armstead, J.G. Jones & M.O. Humphreys,** 2002. An enhanced molecular marker based genetic map of perennial ryegrass (*Lolium perenne*) reveals comparative relationships with other Poaceae genomes. *Genome* 45: 282-295.
- Lefort, F., M. Lally, D. Thompson & G. C. Douglas.** 1998. Morphological traits, microsatellite fingerprinting and genetic relatedness of a stand of elite oaks (*Q. robur* L.) at Tullynally, Ireland. *Silvae Genetica* 47: 257-262.
- Lexer, C., B. Heinze, H. Steinkellner, S. Kamper, B. Ziegenhagen & J. Glossl.** 1999. Microsatellite analysis of maternal half-sib families of *Quercus robur*, pedunculate oak: detection of seed contaminations and inference of the seed parents from the offspring. *Theoretical and Applied Genetics* 99: 185-191.
- Márquez, M. P.** 2003. Caracterización molecular y morfológica de progenies de árboles plus seleccionadas dentro del "Ensayo de procedencias y progenies de *Cordia alliodora*" de CENICAFE – Colombia. Tesis Magíster Scientiae. CATIE. Turrialba. p.
- Marulanda, M. L., M. P. Márquez, R. J. Hernández.** 2002. Selección y Caracterización de germoplasma de *Cordia alliodora* mediante marcadores moleculares RAPD, en Colombia, Sur América. Memorias VII Congreso Interamericano sobre el Medio Ambiente y VI Seminario Internacional del Medio Ambiente y desarrollo sostenible. Cartagena.
- Miller, A. J. & B. A. Schaal.** 2006. Domestication and the distribution of genetic variation in wild and cultivated populations of the Mesoamerican fruit tree, *Spondias purpurea* L. (Anacardiaceae). *Molecular Ecology* 15: 1467-1480.
- Nei, M.** 1972. Genetic distance between populations. *American Naturalist* 106: 283-392.
- O'Malley, D. M., D. Grattapaglia, J. X. Chapparro, P. L. Wilcox, H. V. Amerson, B. H. Liu, R. Whetten, S. McKeand, E. G. Kulhman, S. McCord, B. Crane & R. Sederoff.** 1996. Molecular markers, forest genetics and tree breeding. *Genomes of plants and animals: 21st Stadler Genetics Symposium*.
- Ospina, C., R. Hernández, S. Yandar, F. Aristizabal, E. Rincón, Z. Gil, J. García & N. Patermina** 2008. El nogal cafetero (*Cordia alliodora*). Guías silviculturales para el manejo de especies forestales con miras a la producción de madera en la zona andina colombiana. Edited by CENICAFÉ. Manizales. 43 p.
- Peakall, R. & P. Smouse.** 2006. GENALEX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetics software for teaching and research. *Molecular Ecology notes* 6: 288-295.
- Phillips-Mora, W., H. Rodríguez & P.J. Fritz,** 1995. Marcadores de ADN: Teoría, Aplicaciones y Protocolos de trabajo. Unidad de Biotecnología Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE. Turrialba. 183 p.
- Rohlf, J.** 1989. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Exeter publisher. New York.
- Sebbenn, A. M., P. Y. Kageyama & A. C. Zanatto.** 2002. Estimativas de ganhos genéticos na seleção em populações de *Cariniana legalis* (Mart.) O. Ktze, incorporando informações do sistema misto de reprodução. *Revista do Instituto Florestal* 14: 65-77.
- Sebbenn, A. M., A. C. Zanatto, M. L. Freitas, A. S. Sato & L. C. Etori.** 2005. Genetic variation in *Araucaria cunninghamii* provenances in Luiz Antonio- SP, Brazil. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 4: 1-8.

- Sebbenn, A. M., D. H. Boshier, M. L.M. Freitas, A. C. S. Zanatto, A. S. Sato & L. C. Etori, E. Moraes.** 2007. Results of an International Provenance Trial of *Cordia alliodora* in São Paulo, Brazil at Five and 23 Years of Age. *Silvae Genetica* 56: 3–4.
- Slatkin, M.** 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Smith, O. S. & J. S. C. Smith.** 1992. Measurement of genetic diversity a comparison of isozymic, RFLP, pedigree, and heterosis data. *Maydica* 37:53–60.
- Steinkellner, H., S. Fluch, E. Turetschek, C. Lexer, R. Streiff, A. Kremer, K. Burg & J. Glossl.** 1997. Identification and characterization of (GA/CT)_n -microsatellite loci from *Quercus petraea*. *Plant Molecular Biology* 33: 1093-1096.
- Topol, E. J. & K. A. Frazer.** 2007. The resequencing imperative. *Nature Genetics* 39: 439–440.
- Tessier, C., J. David, P. This, J. M. Boursiquot & A. Charrier.** 1999. Optimization of the choice of molecular markers for varietal identification of *Vitis vinifera* L. *Theoretical and Applied Genetics* 98(1): 171 – 177.
- Ujino, T., T. Kawahara, Y. Tsumura, T. Nagamitsu, H. Yoshimaru & W. Ratnam.** 1998. Development and polymorphism of simple sequence repeat DNA markers for *Shorea curtisii* and other Dipterocarpaceae species. *Heredity* 81: 422-428.
- White, G. & W. Powell.** 1997a. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Swietenia humilis* (Meliaceae): an endangered tropical hardwood species. *Molecular Ecology* 6: 851-860.
- White, G. & W. Powell.** 1997b. Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology* 6: 1195-1197.