

DIVERSIDAD GENÉTICA DEL ENSAYO DE PROCEDENCIAS Y PROGENIES DE *Tabebuia rosea* (Bertol.) D.C., ESTABLECIDO EN CHINCHINÁ-CALDAS, COLOMBIA

GENETIC DIVERSITY OF PROVENANCE AND PROGENY TRIALS OF *Tabebuia rosea* (Bertol.) D.C. ESTABLISHED IN CHINCHINÁ-CALDAS, COLOMBIA

Ana Lucía López González¹, Marta Leonor Marulanda Ángel², Carlos Mario Ospina Penagos³

¹Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad del Quindío.

²Laboratorio de Biotecnología, Universidad Tecnológica de Pereira, Facultad de Ciencias Ambientales.

³Investigador Científico Disciplinada Fitotecnia Centro Nacional de Investigaciones de Café CENICAFÉ

Recibido: Agosto 2 de 2010

Aceptado: Noviembre 29 de 2010

Correspondencia: Centro de Estudios e Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – CIBUQ, Universidad del Quindío, Av. Bolívar calle 12 norte Armenia Quindío. Correo electrónico: analucia@uniquindio.edu.co

RESUMEN

Se evaluó la diversidad genética de *Tabebuia rosea* del ensayo de procedencias y progenies establecido por Cenicafé en Chinchiná-Caldas, Colombia. Se recolectaron hojas jóvenes de nueve individuos por progenie, seleccionando al azar tres de los árboles centrales de cada uno de los tres bloques en que están sembradas las progenies. Las hojas se maceraron en nitrógeno líquido y se mezclaron homogéneamente para extraer el ADN. Se utilizaron los marcadores moleculares AFLP con las combinaciones de primers E-AACxM-CTG, E-ACTxM-CATyE-AGCxM-CTG. Se obtuvieron un total de 172 bandas, cinco de las cuales fueron monomórficas y 83 se presentaron en una sola de las ocho progenies evaluadas. Se obtuvo agrupamientos en un rango de similitud que osciló entre 0,35-0,59, con base en lo cual se planteó que en los materiales existe una diversidad genética considerable que los hace aptos para los trabajos de mejoramiento genético de los cuales hacen parte, igualmente se asumió que existe parecido entre los acervos genéticos de las procedencias de Centroamérica y la única progenie colombiana incluida en el estudio, debido quizá a que las semillas que dieron origen a los árboles estudiados fueron recolectadas en países ubicados dentro del área de distribución natural de la especie. Los resultados obtenidos son esenciales para iniciar el programa de mejoramiento genético de la especie y evidenciaron la necesidad de incluir un mayor número de progenies colombianas en los ensayos de Cenicafé.

PALABRAS CLAVE: *Tabebuia rosea*, guayacán rosado, progenies, diversidad genética, AFLP.

ABSTRACT

The objective of this work is to evaluate the genetic biodiversity of the species *Tabebuia rosea* by the provenance and progeny trials established by Cenicafé in Chinchiná – Caldas, Colombia. To achieve this objective it was conducted a procedure of collection of young leaves of 9 individuals for each offspring, selecting randomly 3 of the central trees of each one of the 3 blocks where the progeny are planted. The leaves were enflouraged in liquid nitrogen and homogeneously mixed for DNA extraction. In this operation, it was used the AFLP molecular markers with the combinations E-AACxM-CTG, E-ACTxM-CATyE-AGCxM-CTG. From this operation resulted a total of 172 bands, 5 of each were monomorphic and 83 were only from 1 of the 8 progeny evaluated. It was also obtained groups with a range of similarity that has varied from 0.35-0.59, which suggests that the material evaluated had a considerable high genetic biodiversity, which makes them fit for the genetic upgrade work. It was also assumed that there is a similarity between the genetic hap of the progenitors of Central America and the only existent Colombian progenitor present in this study. This fact might be due to the fact that these seeds that originated the studied trees were collected in countries located inside the area of the natural distribution of this specie. The results obtained are essential to initiate the program of genetic upgrade of this specie and they prove the necessity of including a high number of Colombian progenies in the assays conducted by Cenicafé.

KEYWORDS: *Tabebuia rosea*, provenance and progeny trials, genetic biodiversity, AFLP.

INTRODUCCIÓN

En Colombia, como en muchas otras regiones del mundo, las poblaciones de especies forestales han sufrido alta presión antrópica que ha determinado la desaparición de algunas de ellas y la reducción de otras. El aprovechamiento de los mejores fenotipos forestales de las especies nativas en el trópico americano, ha dejado como remanente especímenes jóvenes y defectuosos, por lo que en corto tiempo se estrechará la variabilidad genética de estas especies hasta un punto de no retorno (1). De otra parte, la disminución de los bosques naturales, representa una amenaza de extinción para ecotipos y poblaciones de muchas especies (2).

Por lo anterior, especies como *Tabebuia rosea* que son de amplio uso a nivel industrial como maderable, requiere de programas de conservación y/o mejoramiento genético, que permitan su permanencia en sus sitios de origen y en los lugares donde se han adaptado exitosamente, así como en áreas de cultivo; posibilitando su producción con fines comerciales, bajo un esquema de uso sustentable. Sin embargo, para tener éxito en dichos programas es necesario disponer de información básica acerca de la diversidad genética de estas especies, con el fin de garantizar su adecuado manejo.

Tabebuia rosea es una especie de amplia distribución geográfica y de rápido crecimiento, que es utilizada en la industria maderera nacional e internacional, lo que ha traído como consecuencia una severa erosión de su acervo genético en algunas áreas del país (1). Bajo estos criterios, el Ministerio del Medio Ambiente, la Federación Nacional de Cafeteros y Cenicafe, han establecido ensayos de procedencias y progenies de esta especie con fines de mejoramiento genético, para fomentar su cultivo, mejorar la producción de madera de aserrío y diversificar los ingresos de los agricultores. En este sentido, se planteó la utilización de marcadores moleculares AFLP, para caracterizar las progenies establecidas por Cenicafe y aportar información para completar el seguimiento que la entidad viene realizando adichos materiales.

Evaluación de la diversidad genética en plantas utilizando marcadores moleculares.

A lo largo de las poblaciones de una especie, se pueden encontrar tres clases principales de variación: I) la variación en desarrollo, que se manifiesta debido a diferencias de edad entre los árboles; II) la variación

ambiental, que ocurre por diferencias de suelo, clima y factores bióticos, que no afectan por igual a todos los árboles y III) la variación genética, que resulta por diferencias en los códigos genéticos que los individuos heredan de sus progenitores y que los diferencian de individuos de especies diferentes o de otros individuos de la misma especie. Es fácil observar que existe variación entre especies, poblaciones e individuos, pero, la parte más difícil es determinar qué proporción de la variación total es controlada genéticamente, ya que en la naturaleza las tres causas de variación ocurren simultáneamente, siguiendo con frecuencia patrones muy complejos (3).

Generalmente, la variación genética y la variación ambiental se presentan al mismo tiempo y sus efectos sobre los árboles se mezclan. Por ejemplo, árboles con un excelente genotipo para crecimiento, plantados en un suelo pobre, pueden crecer más lentamente que árboles de regular calidad plantados en un suelo fértil. Por esta razón, nada puede decirse del valor genético de un árbol basándose únicamente en su apariencia (4).

En la actualidad se dispone de sistemas de marcadores moleculares basados en el polimorfismo del ADN (por ejemplo RFLP, RAPD, AFLP, SSR), que proporcionan una medida más precisa de la variabilidad, debido a que ellos son independientes de los factores ambientales, tienen el potencial de revelar un alto número de variaciones con amplia cobertura de todo el genoma incluyendo aquellas regiones del ADN no codificadoras (5).

Sin embargo, la caracterización morfológica no puede ser reemplazada por ninguna técnica molecular, sino que estas últimas pueden ser consideradas como complementarias (6). Así mismo, aunque los marcadores moleculares no están comprometidos directamente con la selección de los rasgos de mayor interés, ellos aumentan los conocimientos sobre la domesticación, la estructura de la variabilidad en y entre las especies, las relaciones entre las poblaciones y el flujo de genes entre especies silvestres y cultivadas (7).

Técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism o Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados).

Los marcadores moleculares AFLP están basados en la detección de fragmentos de restricción de ADN, amplificados por PCR o Polymerase Chain Reaction (8). El procedimiento para detectar Polimorfismos en la

Longitud de Fragmentos Amplificados, se basa, como su nombre lo indica, en la amplificación por PCR de fragmentos de restricción homólogos y que presentan tamaños diferentes en los distintos organismos a comparar.

La importancia de la técnica radica en la ingeniosa combinación de la digestión del ADN y la amplificación, que permite gozar de la confiabilidad de los RFLPs y el poder del PCR. Es importante aclarar que la técnica no detecta diferencias de longitud, sino presencia/ausencia de fragmentos de restricción amplificados. El método AFLP identifica y agrupa de acuerdo a las similitudes del patrón de bandas correspondientes a las amplificaciones de los fragmentos de ADN, por tanto la clasificación corresponde a un criterio genético (9).

De acuerdo a (8) el proceso de la técnica AFLP involucra tres pasos:

1. La restricción del ADN con dos enzimas diferentes, generalmente una de corte raro y una de corte frecuente, y la ligación de adaptadores de doble cadena a los extremos de los fragmentos de restricción. El adaptador y las secuencias del sitio de restricción sirven como sitios de ligadura del cebador en los pasos siguientes de la amplificación.

2. La amplificación de subgrupos de fragmentos de restricción usando cebadores AFLP selectivos. Para este propósito, los cebadores usados corresponden a los adaptadores y secuencias de los sitios de restricción y tienen nucleótidos adicionales en el extremo 3' extendiendo a los fragmentos de restricción. Los genomas complejos requieren el uso de más de dos bases selectivas en uno o en ambos cebadores; en este caso, la amplificación es llevada a cabo en dos pasos consecutivos, uno llamado preamplificación y otro llamado amplificación selectiva. La amplificación en dos pasos garantiza una óptima selectividad del cebador, aunque la selectividad de los cebadores con tres bases selectivas es generalmente buena.

3. El análisis de las huellas digitales, para este propósito, los productos de la reacción anterior son separados sobre geles de poliacrilamida. Después que se realiza la electroforesis, los geles son revelados y secados para visualizar las huellas digitales AFLP, las cuales son leídas para su posterior interpretación.

Los marcadores moleculares AFLP son ampliamente utilizados en campos como la taxonomía y la agricultura, en los cuales han servido para resolver problemas de ubicación taxonómica, analizar las relaciones genéticas entre especies, identificar variedades, discriminar cultivares, construir mapas de ligamiento para usarlos en selección asistida por marcadores, estimar tasas de polinización cruzada, entre otros estudios (10-22).

En estudios de diversidad genética, los AFLP han sido uno de los marcadores moleculares más utilizados debido a su amplia cobertura del genoma estudiado y por su reproducibilidad, hecho que se evidencia en el amplio número de trabajos en que se reportó su uso, como los de (23) en *Populus nigra* (álamo negro), (24) en *Quercus petraea*, (25) en *Populus nigra* subsp. *betulifolia*, (26) en *Moringa oleifera*, (27) en *Limonium dufourii*, (28) en *Calycophyllum spruceanum*, (29) en *Azadirachta indica*, (30) en *Avicennia germinans* (mangle negro o iguanero), (31) en *Quercus petraea* y *Q. robur*, (32) en *Guadua angustifolia*, (33) en *Laguncularia racemosa* (34) en *Cordia alliodora* (35) en *Araucaria angustifolia*.

Para el presente trabajo se eligió la técnica AFLP reconociendo que además de poder ser usada para ADN de cualquier origen y complejidad, ofrece otras ventajas como: la posibilidad de acceder a ella en la región, que a su vez determina poder cubrir los costos que representa su implementación; también por la poca cantidad de ADN que se requiere, por utilizar dos enzimas de restricción, por el número de fragmentos generados que es acorde al tamaño del genoma, el bajo ruido de fondo en la lectura gracias a la preamplificación y amplificación que se llevan a cabo y porque no es necesario conocer la secuencia del genoma de la especie estudiada.

Mejoramiento Genético y Ensayos de Procedencias y Progenies

El mejoramiento genético forestal se define como la identificación y desarrollo de poblaciones genéticamente superiores de especies forestales, y el uso de estas poblaciones como fuentes de semilla (u otro material propagativo) para establecer poblaciones mejoradas. El principal objetivo del mejoramiento genético forestal es aumentar la productividad y mejorar la calidad de los árboles que integran los sistemas agroforestales (4).

La existencia de la variación genética es indispensable para el mejoramiento genético forestal; dicha variación

posibilita que, a través de selección, se puedan modificar positivamente (mejorar) las características promedio de una población (4). La naturaleza ha creado la variación necesaria para utilizarla en programas de mejoramiento genético forestal y la principal tarea del mejorador forestal es reconocer la variabilidad, aislarla, reunir la en un árbol deseado y multiplicarla. La mejor herramienta del mejorador forestal para aumentar las ganancias es utilizar al máximo la variación existente y ayudar a desarrollar más variabilidad cuando sea necesario (36).

El método básico para distinguir la variación genética de la variación ambiental, e identificar procedencias, familias o individuos superiores, es el experimento de campo: la única manera que existe actualmente de comparar y estimar la calidad genética de procedencias, familias o clones es plantar y evaluar el material en un experimento replicado y aleatorizado apropiadamente (4). Los árboles producidos a partir de la semilla de un árbol progenitor se conocen como su progenie y las pruebas de progenie se utilizan para determinar el valor genético de los árboles progenitores o para determinar otras características genéticas (36).

Dentro de las fases iniciales del mejoramiento genético está el Ensayo de procedencias y progenies, el cual permite no sólo identificar las mejores fuentes, sino que al mismo tiempo evalúa genéticamente a cada uno de los individuos de las distintas fuentes del ensayo. Esto permite fácilmente convertir el ensayo en un huerto semillero de plántulas al final del período de evaluación, siempre y cuando se asegure que dos descendientes procedentes de un mismo árbol (familia) no se puedan recombinar entre sí (4).

Tradicionalmente la descripción y cuantificación de la

variación genética en especies de árboles forestales se ha realizado a través del análisis dendrométrico de caracteres fenotípicos en Ensayos de Procedencias y Progenies, pero también es cierto que se requieren muchos años para completar dicha información y por esto, en árboles mejorados los marcadores moleculares pueden ser usados como una poderosa herramienta para manejar la diversidad genética a diferentes niveles de un programa de mejoramiento (37). Al respecto, (38) afirma que los marcadores moleculares se utilizan en el estudio de la diversidad genética, información que es importante en los programas de mejoramiento, permitiendo calcular distancias genéticas y variación inter e intraespecífica.

De acuerdo con (39) es necesario establecer en etapas previas al mejoramiento, un proceso que viabilice la transferencia de variabilidad genética útil al material adaptado, manteniendo las combinaciones multialélicas presentes en el material elite. El pre-mejoramiento (pre-breeding) o valorización genética de germoplasma (germplasm enhancement) es la respuesta a estos requerimientos y en este sentido, los marcadores moleculares han resultado ser una herramienta útil para revalorizar los recursos genéticos presentes en la colecciones de germoplasma.

MÉTODOS

Se recolectó material en el Ensayo de Procedencias y Progenies, establecido por Cenicafé en la finca La Romelia, Chinchiná, Caldas. En este ensayo, cada sitio experimental (independiente del número de tratamientos), consta de n-tratamientos, tres réplicas por tratamiento, dispuestos en bloques al azar. La unidad experimental consta de 25 árboles, con una parcela efectiva de 9 árboles centrales (40).

Tabla 1. Progenies de *Tabebuia rosea* establecidas en la Finca La Romelia, Chinchiná, Caldas*.

Número de Progenie	Código	País de Procedencia	Bloque I	Bloque II	Bloque I
1	Abr-95-30	Guatemala (Jutiapa)	7	21	27
2	Ago-95-30	Guatemala (Jutiapa)	2	19	25
3	Abr-95-24	Guatemala (Escuintla)	1	14	33
4	Mar-96-09	Guatemala (Escuintla)	9	20	32
5	506/92	Guatemala (Zacapa)	6	18	28
6	061/96A	El Salvador (Santa Ana)	10	22	31
7	061/96 *	El Salvador (Santa Ana)	11	24	26
8	SO-2386	Nicaragua (Belén)	5	23	34
9	CU-II-1	Colombia (Cundinamarca)	3	13	35
10	M-I-1 *	Colombia (Magdalena)	12	17	36

* Datos suministrados por Cenicafé.

cuales la combinación más informativa fue E-AAC x M-CTG con 68 bandas reveladas, seguida de E-ACT x M-CAT que produjo 58 fragmentos AFLP y E-AGC x M-CTG con 46. Cinco de las 172 bandas obtenidas fueron monomórficas y hubo 83 bandas que se presentaron en una sola de las ocho progenies evaluadas.

Comparando estos resultados con los obtenidos por (44) en 43 individuos de diez localidades de *Tabebuia rosea* en la zona cafetera, en los que se observaron 248 bandas, 67 de ellas exclusivas de algunos de los individuos evaluados; puede decirse que las progenies estudiadas evidencian su diversidad a nivel de procedencia y a nivel genético.

Progenie	1	2	3	4	5	6	7	8
1	1.0000							
2	0.5794	1.0000						
3	0.3542	0.3762	1.0000					
4	0.4902	0.5608	0.4583	1.0000				
5	0.5143	0.5455	0.3030	0.5905	1.0000			
6	0.3400	0.3429	0.4043	0.3800	0.3301	1.0000		
7	0.3478	0.3711	0.3256	0.3261	0.3789	0.4222	1.0000	
8	0.3519	0.3894	0.3726	0.4259	0.3604	0.4528	0.3265	1.0000

* Los números representan las progenies así: 1 Guatemala (Abr-95-30), 2 Guatemala (Ago-95-30), 3 Guatemala (Abr-95-24), 4 Guatemala (Marzo-96-09), 5 Guatemala (506/92), 6 El Salvador (061/96A), 7 Nicaragua (SO-2386) y 8 Colombia (CU-II-1).

Figura 1. Matriz de Similitud entre ocho progenies de *Tabebuia rosea*, establecidas en la Finca La Romelia, Chinchiná, Caldas, obtenida con el índice de similitud de Dice. *

La similitud osciló entre 0,30-0,59 (Figura 1) siendo las progenies más similares (0,59) de Guatemala Marzo-96-09 y 506/92, contrastando con que la de menor similitud (0,30) fuera Abr-95-24 que también procede de Guatemala. En comparación con individuos de 10 localidades de la zona cafetera colombiana, en los que se observó un rango de similitud entre 0,54–0,77 (44), las progenies evaluadas presentaron un nivel más bajo de similitud, lo que resulta obvio si se considera que los materiales proceden de diferentes países.

No obstante, el haber empleado ADN producto de la extracción en tejido proveniente de nueve individuos de cada procedencia, conlleva a pensar que posiblemente el nivel de similitud entre los materiales de cada país sea menor y que por tanto, su valor para trabajos de mejoramiento genético de la especie, sea aún mayor.

En el fenograma (Figura 2) es posible observar el agrupamiento de la mayoría de las progenies de Guatemala, excepto Abr-95-24, esta última, mostró mayor relación con las progenies de El Salvador 061/96A y Colombia CU-II-1, quedando separada la progenie de Nicaragua SO-2386 que mostró ser la de menor similitud.

Análisis de Coordenadas Principales entre progenies de *Tabebuia rosea*, pertenecientes al ensayo establecido por Cenicafé en Chinchiná Caldas

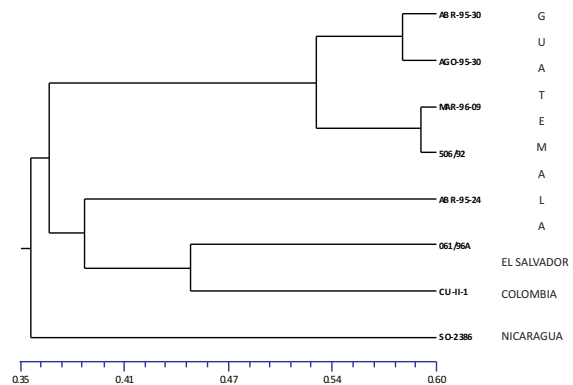


Figura 2. Fenograma de ocho progenies de *Tabebuia rosea* establecidas en la Finca La Romelia, Chinchiná, Caldas, obtenido mediante el índice de similitud de Dice y empleando el método de agrupamiento UPGMA.

El análisis de coordenadas principales mostró las progenies estudiadas dispersas en los cuadrantes del gráfico, corroborando que estos materiales son diversos. Las dos primeras coordenadas aportan 40.57 de la variabilidad (23.11 y 17.46 respectivamente).

En la Figura 3 se observa que hacia el lado derecho se ubican cuatro progenies procedentes de Guatemala que corresponden a un grupo de progenies estrechamente relacionadas entre sí y hacia el lado izquierdo aparecen las progenies con menor similitud, donde la progenie de Nicaragua es la más alejada de todas, seguida por el grupo conformado por las progenies de El Salvador 061/96^a, Colombia CU-II-1 y Guatemala Abr-95-24.

En el Ensayo de Procedencias y Progenies (Tabla 1), se muestrearon 9 individuos (3 elegidos al azar por cada uno de los tres bloques o repeticiones) de cada una de las 10 progenies allí presentes, obteniéndose un total de 90 muestras para ser analizadas.

Se tomaron hojas jóvenes y bien desarrolladas, con el menor grado de lignificación posible y en buen estado fitosanitario. Los folíolos de las hojas recolectadas fueron envueltos en papel aluminio, se marcaron indicando la progenie y el número del árbol muestreado y se almacenaron en frío dentro de una nevera de icopor con hielo seco. Todas las muestras fueron llevadas al Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira UTP, donde fueron procesadas.

En el laboratorio se maceró el tejido foliar en nitrógeno líquido y se mezclaron cantidades iguales del tejido foliar macerado de cada uno de los nueve individuos de cada progenie, quedando para procesar diez muestras de 1 g cada una.

Extracción y Cuantificación de ADN

El ADN necesario para los marcadores moleculares AFLP se extrajo utilizando el protocolo de (41), modificado por (34). El ADN total extraído se cuantificó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, dejando migrar las muestras durante una hora en cámara de electroforesis horizontal Hoefer Supersab, Pharmacia Biotech. Modelo: HE-100-20-1.0. La comparación de las concentraciones de ADN se realizó con patrones de 50, 100, 150 y 200 ng/ μ l. Los geles fueron teñidos con bromuro de etidio y visualizados en un transiluminador Hoefer Macro Vue UV-25 de Pharmacia Biotech. El ADN evaluado, cuya calidad y concentración se ajustaron a los requerimientos de la técnica AFLP, se llevó a una concentración de 100 ng/ μ l y se almacenó a -20°C.

Marcadores Moleculares AFLP

Para la metodología AFLP, se utilizó el kit de Invitrogen AFLP Analysis System I, siguiendo la técnica convencional de (8). Se realizaron las respectivas amplificaciones en un Termociclador PTC-100™ Programable Thermal Controller Peltier-Effect Cycling de MJ Research, Inc. Se utilizaron las combinaciones de primers E-AAC x M-CTG, E-ACT x M-CAT y E-AGC x M-CTG. Los productos de la amplificación selectiva se

diluyeron en buffer de carga, se desnaturalizaron y se llevaron a electroforesis en gel de poliacrilamida al 6%.

Las muestras se dejaron correr en cámara de electroforesis vertical Sequi-Gen GT Sequencing Cell de BioRad, a 110 W por 1:45 horas, a una temperatura de 50°C. La tinción de los fragmentos amplificados (bandas de ADN) en cada uno de los geles obtenidos, se realizó con nitrato de plata (AgNO₃) bajo agitación constante en agitador Heidolph Unimax 2010. La visualización para la lectura de bandas se hizo con la ayuda de un transiluminador de luz blanca.

Procesamiento Estadístico de los Datos

Con los datos moleculares obtenidos se elaboró en Excel una matriz Presencia/Ausencia de bandas polimórficas, donde 0 indica ausencia y 1 indica presencia. Esta matriz se analizó mediante el paquete estadístico Numerical Taxonomy and Multivariate System NTSYSpc 2.02i (42) de Applied Biostatistics, generando las correspondientes matrices de similitud con la utilización del coeficiente de (43) en el cual la Similaridad = $2a_{ij}/(2a_{ij}+b_i+c_j)$ donde a es el número de bandas comunes para las muestras i y j, b es el número de bandas presentes solo en la muestra i y c es el número de bandas presentes sólo en la muestra j; este coeficiente confiere mayor peso a las coincidencias y sus valores varían entre 0 y 1.

Utilizando el algoritmo de agrupamientos UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean o Ligamiento Promedio Utilizando la Media Aritmética No Ponderada) se construyeron los respectivos fenogramas para visualizar los agrupamientos de las progenies cuyo ADN amplificó. Así mismo, se realizó un Análisis de Coordenadas Principales, con el fin de visualizar los agrupamientos en un gráfico que permitiera complementar los datos aportados por el fenograma.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De las 10 muestras de ADN del Ensayo de Procedencias y Progenies establecido por Cenicafé ocho amplificaron satisfactoriamente; por lo que debieron excluirse las muestras correspondientes a una progenie colombiana M-I-1 y una de El Salvador 061/96. Se obtuvo un total de 172 bandas, en las

La similitud encontrada entre las ocho progenies evaluadas muestra que entre ellas existe una cantidad

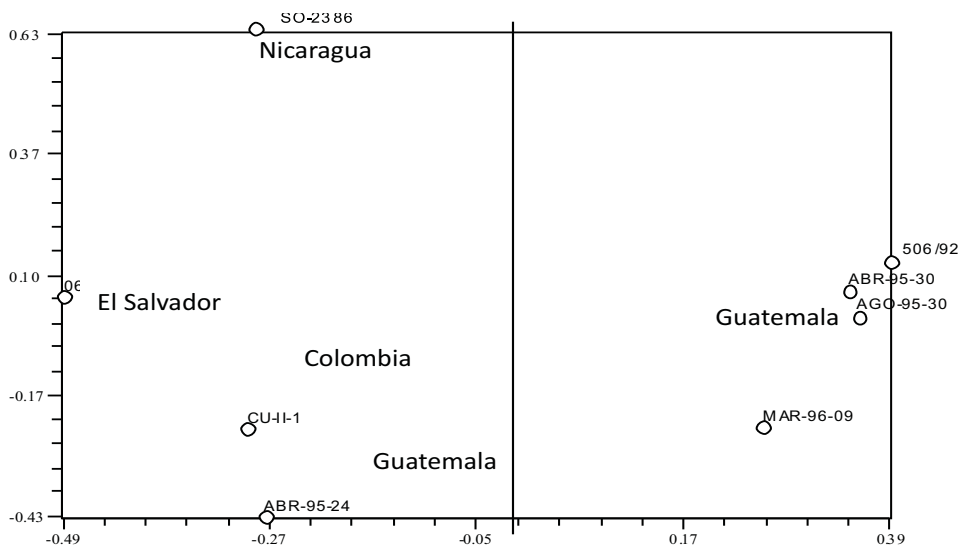


Figura 3. Análisis de Coordenadas Principales para ocho progenies de *Tabebuia rosea* de la Finca La Romelia, Chinchiná-Caldas.

trabajos orientados a salvar la diversidad genética adaptable (que es de interés para los mejoradores) deben basarse en el conocimiento de la base genética de adaptación.

Por su parte, la progenie de Nicaragua que es la que aporta mayor diversidad para el programa de mejoramiento genético, debe ser considerada desde este punto de vista, como la primera candidata para la realización de cruces en los que de antemano se pueda esperar buenos resultados, motivo por el cual su evaluación en cuanto a caracteres agronómicos y genéticos ha de ser prioritaria.

Por lo anterior, debe considerarse la posibilidad de evaluar de manera individual los materiales que hacen

parte del Ensayo de Procedencias y Progenies que tiene Cenicafé, máxime si se tiene en cuenta que como lo afirman (37) la variación genética entre poblaciones refleja el nivel de diferenciación poblacional. Es importante conocer la variación genética al interior de las progenies, de tal manera que pueda ser tenida en cuenta para dar continuidad al proceso de mejoramiento genético de *T. rosea* en el país; puesto que como lo plantean (36) en un programa de mejoramiento se tiene la necesidad, a largo plazo, de obtener una amplia base genética, esencial para continuar el progreso del mismo al cabo de muchas generaciones.

Adicionalmente, puede decirse que la diversidad existente entre los materiales procedentes de Centro y

Suramérica, justifica la necesidad de conocer la estructura poblacional de la especie a lo largo de los países que se hallan dentro de su rango de distribución natural y determinar cuáles son sus centros de diversidad, con el fin de conocer la cantidad y distribución de la diversidad genética de la especie, para emplearla de forma eficiente dentro de los programas de mejoramiento.

Aunque se desconoce la diversidad genética que albergan las poblaciones naturales de *T. rosea* en Colombia, el hecho que el programa de mejoramiento genético de la especie esté partiendo con material representativo de los acervos genéticos de los países que están dentro del rango de su distribución natural, es de entrada una ganancia puesto que se dispone de una base genética amplia que augura la obtención de resultados exitosos y que se constituye en un motivo para dar continuidad al proceso de mejoramiento y de estudio de su diversidad genética, pero en el cual es necesario incluir más representantes de la diversidad genética colombiana, dentro de los cuales valdría la pena incluir materiales del Urabá antioqueño y chocono, donde se ha reportado la existencia de la especie.

CONCLUSIONES

Las progenies evaluadas dentro del Ensayo de Procedencias y Progenies que tiene establecido Cenicafé, muestran niveles de similitud que reflejan la procedencia del material de países ubicados dentro del área de distribución natural de la especie.

Existe considerable diversidad genética entre las progenies de *T. rosea* evaluadas, siendo la de Nicaragua la de mayor interés para el programa de mejoramiento genético del cual hacen parte, porque al parecer su genotipo representa la posibilidad de utilizarla como fuente de variabilidad en el proceso.

Los agrupamientos realizados con base en la caracterización molecular de los materiales de *Tabebuia rosea* del Ensayo de Procedencias y Progenies de Cenicafé, permitieron establecer que debido a su diversidad genética éstos revisten especial interés para la realización de trabajos de mejoramiento genético y/o conservación de la especie.

Es pertinente realizar la caracterización molecular de la totalidad de los árboles pertenecientes al Ensayo de Procedencias y Progenies, considerando cada una de sus repeticiones e incluir muestras de los árboles madre de los cuales se obtuvo las semillas, con el fin de obtener una información más completa que permita la adecuada utilización del germoplasma disponible en dicho ensayo.

Cenicafé debe considerar la posibilidad de incluir un número mayor de progenies colombianas dentro del material que servirá de base para el mejoramiento genético de *Tabebuia rosea*, con el fin de garantizar la disponibilidad de la variabilidad genética adaptativa a las condiciones ambientales propias del país y específicamente de los sitios donde van a establecerse los árboles mejorados.

BIBLIOGRAFÍA

1. TRIVIÑO D., T. (1990). "Algunos Sitios de Recolección de Semillas Forestales Nativas en Colombia: *Bombacopsis quinata* (Jacq.) Dugand, *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC. y otras Especies. En Mejoramiento de Semillas y Fuentes Semilleras en Colombia, Proyecto Cooperativo CONIF-INDERENA-CIID". Serie de Divulgación, (1), 1- 24.
2. PINTO P., G. y SIERRA, R. (1995). "Estado Actual de la Oferta y Demanda de Semillas Forestales en Colombia". En Identificación, Selección y Manejo de Fuentes Semilleras. Programa de Investigación en Semillas de Especies Forestales Nativas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-CONIF-INSEFOR. Serie Técnica, (32), 11-20.
3. MESÉN, F. (1995). "La Variación Natural como Base para el Mejoramiento Genético Forestal". En Identificación, Selección y Manejo de Fuentes Semilleras. Programa de Investigación en Semillas de Especies Forestales Nativas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural-CONIF-INSEFOR. Serie Técnica, (32), 39-46.
4. CORNELIUS, J. P.; MESÉN, J. F. y COREA, E. A. (1994). *Manual Sobre Mejoramiento Genético Forestal, con Referencia Especial a América Central*. Proyecto Mejoramiento Genético Forestal. Turrialba: Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza CATIE.
5. CORNIDE, M. T. y LEÓN, O. (1998). "Principales Aplicaciones de los Marcadores Moleculares". En CORNIDE, M. T. *Uso de los Marcadores Moleculares en la Genética y la Selección de Plantas*. (18-25). La Habana: CNIC.
6. KARP, A., KRESOVICH, S. y BHAT, K. V., AYAD, W. G. and HODGKIN, T. (1997). "Molecular Tools in Plant Genetic Resources Conservation: a Guide to the Technologies". IPGRI Technical Bulletin. No. 2. Rome:International Plant Genetic Resources Institute.
7. LANAUD, C. (1999). "Use of Molecular Markers to Increase Understanding of Plant Domestication and to Improve the Management of Genetic Resources; Some Examples with Tropical Species". In *Plant Genetic Resources Newsletter*, (119), 26-31.
8. VOS, P., HOGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, T., HORNES, M., FRIJTERS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M. and ZABEU, M. (1995). "AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting". En *Nucleic Acids Research*, No. 21 (23), 4407-4414.
9. RODRÍGUEZ B., F. (2000). "Curso AFLP's no Radiactivo". Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI.
10. GAIOTTO, F. A.; BRAMUCCI, M. and GRATTAPAGHA, D. (1997). "Stimulation of Outcrossing Rate in a Breeding Population of *Eucalyptus urophylla* With Dominant RAPD and AFLP Markers". In *Theoretical and Applied Genetics*. Berlin; Springer-Verlag. Oct. V. 95 (5/6) p. 842-849.
11. LERCETEAU, E. and SZMIDT, A. E. (1999). "Properties of AFLP Markers in Inheritance and Genetic Diversity Studies of *Pinus sylvestris* L." In *Heredity*. 82: 3, 252-260; 24 ref.
12. ERSCHARDI, S.; HABERER, G.; SCHÖNIGER, M. and TORRES-RUIZ, R. A. (2000). "Estimating Genetic Diversity of *Arabidopsis thaliana* ecotypes with Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)". In *Theoretical Applied Genetics*. 1000:633-640.
13. CRESSWELL, A.; SACKVILLE H., N. R.; ROY, A. K. and VIEGAS, M. F. (2001). "Use of Amplified Fragment Length Polymorphism Markers to Assess Genetic Diversity of *Lolium* species from Portugal". In *Molecular Ecology*. 10:229-241.
14. QAMARUZ-Z., F.; FAY, M. F.; PARKER, J. S. and CHASE, M. W. (s.f.). "The Use of AFLP Fingerprinting in Conservation Genetics: A Case Study of *Orchis simmia* (Orchidaceae)".

15. RAJAPAKSE, S., ZHANG, L., BALLARD, R. E. and BYNE, D. H. (2001). "AFLP Marker Development in Rose Genetic Mapping: Comparison of Three Restriction Enzyme Pairs". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. Acta Hort. 546, ISHS. 619-627.
16. HAN, T. H., VAN ECK, H. J., DE JEU, M. J. and JACOBSEN, E. (2001). "Use of AFLP Marker Technique for Classification of *Alstroemeria* spp. and Construction of a Linkage Map in *Alstroemeria aurea*". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. Acta Hort. 546, ISHS. 151-158.
17. ZHANG, D., BESSE, C., CAO, M. Q. and GANDELIN, M. H. (2001). "Evaluation of AFLPs for Variety Identification in Modern Rose (*Rosa hybrida* L.)". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. In: Acta Hort. 546, ISHS. 351-357.
18. HURTADO, M. A., BADENES, M. L., LLÁCER, G., WESTMAN, A., BECK, E. and ABBOTT, G. A. (2001). "Contribution to Apricot Genetic Analysis With RFLP, RAPD And AFLP Markers". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. Acta Hort. 546, ISHS. 417-420.
19. HAGEN, L. S., LAMBERT, P. AUDERGON J. M. and KHADARI, B. (2001). "Genetic Relationships Between Apricot (*Prunus armeniaca* L.) And Related Species Using AFLP Markers". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. Acta Hort. 546, ISHS. 205-208.
20. BERIO, T., MORREALE, G., GIOVANNINI, A., ALLAVENA, A., ARRU, L., FACCIOLI, P., TERZI, V. and PECCHIONI, N. (2001). "RAPD and AFLP Genetic Markers for the Characterisation of *Osteospermum* Germoplasm". Proc. Int. Symp. On Molecular Markers. Eds. Doré, Dosba & Baril. Acta Hort. 546, ISHS. 171-176.
21. MARQUES, C. M.; VÁSQUEZ-KOOL, J.; CAROCHA, V. J.; FERREIRA, J. G.; O'MALLEY, D. M.; LIU, B. -H. and SEDEROFF, R. (1999). "Genetic Dissection of Vegetative Propagation Traits in *Eucalyptus tereticornis* and *E. globulus*". In Theoretical Applied of Genetics 99:936-946.
22. BREYNE, P.; GYSEL, A. van; MONTAGU, M. van; VAN GYSEL A. and van MONTAGU, M. (1997). „AFLP- Based Molecular Markers for Genome Diversity Studies". Eleven forum for applied biotechnology. Proceedings Part I. Mededelingen Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische. Wetenschappen, Universiteit Gent. 62: 4a, 1443-1449.
23. ARENS, P.; COPOS, H.; JANSEN, J. and VOSMAN, B. (1998). "Molecular genetic analysis of black poplar (*Populus nigra* L.) along Dutch rivers". In Molecular Ecology, (7), 11-18.
24. GREEF B. de; TRIEST, L.; CUYPER B. de ; SLYCKEN, J. van ; de GREEF B. ; de CUYPER B. and van SLYCKEN, J. (1998). "Assessment of Intraspecific Variation in Halfsibs of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. Plus Trees". In Heredity, 81 (3), 284-290.
25. WINFIELD, M. O.; ARNOLD, G. M.; COOPER, F.; LE RAY, M.; WHITE, J.; KARP, A. and EDWARDS, K. J. (1998). "A Study of Genetic Diversity in *Populus nigra* subsp. *betulifolia* in the Upper Severn Area of the UK Using AFLP Markers". In Molecular Ecology, (7), 3-10.
26. MULUVI, G. M.; SPRENT, J. I.; SORANZO, N.; PROVAN, J.; ODEE, D.; FOLKARDS, G.; McNICOL, J. W. and POWELL, W. (1999). "Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Analysis of Genetic Variation in *Moringa oleifera* Lam". In Molecular Ecology, (8), 463-470.
27. PALACIOS, C.; KRESOVICH, S. and GONZÁLEZ-CANDELAS, F. (1999). "A Population Genetic Study of the Endangered Plant Species *Limonium dufourii* (Plumbaginaceae) Based on Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)". In Molecular Ecology, (8), 645-657.

28. RUSSELL, J. R.; WEBER, J. C.; BOOTH, A.; POWELL, W.; SOTELO-MONTES, C. and DAWSON, I. K. (1999). "Genetic Variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis". In *Molecular Ecology*, (8), 199-204.
29. SING., A.; NEGI, MS; RAJAGOPAL, J; BHATIA, S.; TOMAR, UK; SRIVASTAVA, P. S. and LAKSHMIKUMARAN, M. (1999). "Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers". In *Theoretical and Applied Genetics*, (99), 1-2, 272-279.
30. CERÓN S., I., TORO P., N. y CÁRDENAS H., H. (2002). "Estimación de la Diversidad Genética y Análisis de la Variación Morfológica del Mangle Negro o Iguanero (*Avicennia germinans* L.) de la Costa Pacífica Colombiana". En: Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Asociación Latinoamericana de Botánica, Asociación Colombiana de Botánica. Libro de Resúmenes VIII Congreso Latinoamericano de Botánica. Bogotá: Unibiblos.
31. COART, E., LAMOTE, V., DE LOOSE, M., VAN BOCKSTAELE, E., LOOTENS, P. and ROLDÁN-R., I. (2002). "AFLP Markers Demonstrate Local Genetic Differentiation Between Two Indigenous Oak Species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) in Flemish Populations". In *Theoretical and Applied Genetics*, (105), 431-439.
32. MARULANDA, M., MÁRQUEZ, M. P. and LONDOÑO, X. (2002). "AFLP Analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with Emphasis on the Coffee Region". In *Bamboo Science and Culture: The Journal of the American Bamboo Society*, 16(1), 32-42.
33. GONZÁLEZ, I. (2003). "Estimación de la Variabilidad Genética Molecular de *Laguncularia racemosa* en la Costa Pacífica Colombiana, Mediante el Uso del Marcador Molecular AFLP". Trabajo de investigación. Universidad del Valle. Facultad de Ciencias. Maestría en Ciencias – Biología. Cali.
34. 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 Cenicafé-Colombia". Trabajo de Investigación. Maestría Escuela de Postgrado-Centro Agronómico Tropical de Investigación CATIE. Turrialba.
35. STEFENON, V. M. y NODARI, R. O. (2003). "Marcadores Moleculares en el Mejoramiento Genético de *Araucaria angustifolia*". In: *Revista Biotecnología Ciência & Desenvolvimento*. Edição No.31- julho/desembro. 95-99.
36. ZOBEL, B. y TALBERT, J. (1984). *Applied Forest Tree Improvement*. US: John & Wiley Sons Eds.
37. GRATTAPAGLIA, D.; CIAMPI, A. Y.; GAIOTTO, F. A.; SQUILASSI, M. G.; COLLEVATTI, R. G.; RIBEIRO, V. J.; REIS, A. M.; GANDARA, F. B.; WALTER, B. M.; BRONDANI, P. V.; BRUNS, S. (ed.); MANTELL, S. (ed.); TRAGARDH, C. (ed.) and VIANA, A. M. (1998). "DNA technologies for forest tree breeding and conservation. Recent advances in biotechnology for tree conservation and management". *Proceedings of an IFS Workshop, Florianopolis, Brazil*. 50-61.
38. ÁNGEL, F. (2000). "Marcadores Moleculares Usos y Aplicaciones". En RODRÍGUEZ B., F. Curso AFLP's no Radiactivo. (55-64). Bogotá: Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas-SINCHI.
39. PRITSCH, C. (2001). El pre-mejoramiento y la utilización de los recursos fitogenéticos. En: Ana Berretta (Coord.) ; Mercedes Rivas (Coord.) "Estrategia en recursos fitogenéticos para los países del Cono Sur". PROCISUR. Montevideo,UY.
40. CENTRO NACIONAL DE INVESTIGACIONES DE CAFÉ CENICAFÉ - FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS - MINISTERIO DEL MEDIO AMBIENTE. (2000). Convenio Especial de Cooperación para Investigación Forestal con Especies Nativas. Informe Ensayo de Procedencias y Progenies, para dos Especies Forestales Tropicales de Alto Valor Comercial.
41. DOYLE, J. J. and DOYLE, J. L. (1990). "Isolation of Plant DNA From Fresh Tissue". In *Focus* (12), 13-15.

42. ROHLF, F.J. (1997). NTSYS version 2.02i. © by Applied Biostatistics, Inc.
43. DICE, I. R. (1945). "Measures of the amount of Ecological Association Between Species". In *Ecology*, (26), 295-302.
44. LÓPEZ G., A. L. Y MARULANDA A., M. L. (2005). "Evaluación molecular de la diversidad genética de *Tabebuia rosea*, en la zona cafetera colombiana". In: *Revista de la Asociación Colombiana de Herbarios ACH. Memorias XXV Reunión Anual*. Armenia. Universidad del Quindío. 120-127.
45. KRUTOVSKII, K. V. and NEALE, D. B. (2001). "Forest Genomics for Conserving Adaptive Genetic Diversity". Documento de Trabajo de Recursos Genéticos Forestales RGF/3. Servicio de Desarrollo de Recursos Forestales, Dirección de Recursos Forestales. FAO. Roma.