UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Estudio de la diversidad genética en *Eucalyptus globulus* (Labill.) empleando marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR)

José Alejandro Sánchez Buitrago

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Bogotá, Colombia
2013

Estudio de la diversidad genética en *Eucalyptus globulus* (Labill.) empleando marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR)

José Alejandro Sánchez Buitrago
Código: 07790714

Magister en
Ciencias Agrarias Énfasis Genética y Fitomejoramiento

Directora
Prof. Teresa Mosquera Vásquez

Línea de Investigación
Genética y Fitomejoramiento

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Agronomía
Bogotá, Colombia
2013

Resumen

Eucalyptus globulus (Labill.) es una de las especies forestales más plantadas a nivel mundial, principalmente en las regiones templadas. En Colombia ha llegado a ser la segunda especie forestal más plantada. Para aumentar la productividad y la calidad de las plantaciones, se establecieron en el país, poblaciones de mejoramiento con selecciones australianas y colombianas. Conocer la diversidad genética de estas poblaciones es importante dado que con el tiempo la selección tiende a reducir su diversidad genética. En esta investigación se estudió la diversidad genética de un huerto semillero clonal de *Eucalyptus globulus* (Labill.) compuesto por 25 genotipos de los cuales 14 provienen de Australia y 11 de Colombia. Mediante el empleo de 13 marcadores moleculares microsatélites y basado en el análisis de frecuencias alélicas, se encontraron valores bajos con relación a otros estudios en la heterocigosidad esperada (He: 0,608) y en el promedio del número de alelos (Na: 4,923), atribuidos principalmente al reducido número de genotipos presentes en el huerto. Las poblaciones australiana y colombiana, son genéticamente similares, de acuerdo con los resultados de identidad genética (I: 0,864) y distancia genética (D: 0,147) de Nei, y con el valor F_{ST}: 0,036 del AMOVA. Para establecer las relaciones de similaridad genética entre genotipos, se usó el índice de Jaccard con el cual no se encontraron valores de similaridad superiores a 0,54, mostrando que entre los genotipos del huerto se presenta alta diferenciación genética. El estudio de la diversidad genética del huerto semillero clonal conduce a recomendar la introducción de genotipos seleccionados al huerto para incrementar su diversidad genética, así como la planeación de estrategias de polinización controlada, con el fin de optimizar la producción y la calidad genética de la semilla.

Palabras claves: diversidad genética, microsatélites, *Eucalyptus globulus* (Labill.), programa de mejoramiento, huerto semillero.

Abstract

Eucalyptus globulus (Labill.) is one of the most planted tree species in the world, mainly in temperate regions. In Colombia it has become the second most planted tree species. To increase productivity and quality of the plantations, breeding populations with Australian and Colombian selections have been established in the country. It is necessary to know the genetic diversity since it is becoming important due to selection having the potential to reduce genetic diversity over time. This research studied the genetic diversity in a *Eucalyptus globulus* (Labill.) grafted seed orchard, consisting of 25 genotypes, 14 from Australia and 11 from Colombia. Based on the allelic frequencies analysis of thirteen microsatellite markers used in this study, the expected heterozygosity (He: 0.608) and the average number of alleles (Na: 4.923) were lower in comparison with other studies; these results are mainly attributed to the small number of individuals in the orchard. According to the results of genetic identity (I: 0.864), genetic distance (D: 0.147) Nei and the value (F_{ST}: 0.036) of AMOVA the Australian and Colombian populations are genetically similar. Jaccard similarity indices were used to establish similarity relationships between genotypes, since values were lower than (0.56) there is high genetic differentiation between genotypes. The genetic diversity study of the grafted seed orchard shows that a higher number of selected genotypes are required in the seed orchard. Moreover, it is greatly necessary to establish large-scale manual pollination systems in order to optimize seed production and its genetic quality.

Keywords: genetic diversity, microsatellites, *Eucalyptus globulus* (Labill.) breeding program, seed orchard.

Contenido

	Pág.
Resumen y Abstract	V
Introducción	1
1.Objetivos	2
2. Revisión de literatura	3
2.1 La producción forestal de *Eucalyptus globulus* (Labill.)	3
2.2 El mejoramiento genético forestal y los estudios de diversidad	5
2.3 Mejoramiento de *Eucalyptus globulus* (Labill.) en Colombia	7
2.4 Marcadores morfológicos y moleculares	9
2.5 Marcadores basados en la amplificación de microsatélites	12
2.6 Investigaciones con marcadores moleculares en *Eucalyptus globulus* (Labill.)	12
3.Materiales y métodos	15
3.1 Material vegetal	14
3.2 Extracción de ADN	16
3.3 Genotipificación	16
4. Análisis estadístico	19
5. Resultados	20
5.1 Genotipificación	20
5.2 Frecuencias alélicas	20
5.3 Equilibrio Hardy-Weinberg	27
5.4 Distancia genética entre poblaciones	28
5.5 Análisis molecular de varianza (AMOVA)	28
5.6 Relaciones de similaridad genética entre genotipos	30
6. Discusión	33
6.1Índice de heterocigosidad	33

6.2 Heterocigosidad esperada 34
6.3 Riqueza alélica 35
6.4 Heterocigosidad observada (Ho) 36
6.5 Número efectivo de alelos (Ne) 36
6.6 Diferenciación genética entre poblaciones 37
6.7 Amplificación de secuencias 38
6.8 Recomendaciones para el manejo del germoplasma del (huerto semillero clonal (HSC) El Salitre 39
6.8.1 Respecto a la consanguinidad. 39
6.8.2 Respecto al número de individuos del HSC 39
6.8.3 Respecto a la polinización 40
Anexo A: Genotipos y cantidad de ramets del huerto semillero clonal El Salitre 40
Anexo B: Código de identificación de los ramets del huerto semillero clonal El Salitre 42
Anexo C: Reactivos y concentraciones del protocolo de extracción de ADN adaptado de (Ribeiro y Lobato, 2007 43
Bibliografía 45

Lista de figuras

Pág.

Figura 1: Proporción de frecuencias de alelos en *E. globulus*. a) En locus Eg 008 población australiana b) En locus Eg 024 población colombiana 27

Figura 2: Proporción de frecuencias de alelos en *E. globulus*. a) En el locus Eg 131 población australiana b) En el locus Eg 030 población colombiana 27

Figura 3: Porcentajes de la varianza molecular AMOVA de las poblaciones australiana y colombiana 29

Figura 4: Dendrograma Jerárquico de afinidad genética para 25 genotipos de *E. globulus*, en el huerto semillero clonal El Salitre, coeficiente de Jaccard, agrupamiento por UPGM 31

Lista de tablas

Pág.

Tabla 1: Marcadores microsatélites seleccionados para el análisis molecular en el estudio de diversidad de genética de *E. globulus* 18

Tabla 2: Marcadores microsatélite amplificados y condiciones de amplificación en la especie 20

Tabla 3: Número de individuos homocigotos en cada locus encontrados para las poblaciones australiana y colombiana en *E. globulus* 21

Tabla 4: Alelos y heterocigosidad por locus en las poblaciones de Australia y de Colombia de *E. globulus* 22

Tabla 5: Índices de información y de fijación, He insesgada por población 23

Tabla 6: Aporte de las poblaciones australiana y colombiana a la diversidad alélica total en *E. globulus* 24

Tabla 7: Heterocigosidad esperada y estadísticos F para el total de genotipos de *E globulus* 25

Tabla 8: Relación entre heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada, heterocigosidad máxima esperada e índice de heterocigosidad *en E. globulus* 26

Tabla 9: Resultados de la prueba de Chi-Cuadrado para el equilibrio Hardy-Weinberg con 13 loci para 25 genotipos del HSC El Salitre. 28

Tabla 10: Análisis molecular de varianza de frecuencias alélicas para las poblaciones australiana y colombiana 29

Tabla 11: Estadísticos F a partir del análisis molecular de varianza 29

Introducción

La especie *Eucalyptus globulus* (Labill.) es una de las especies forestales que más se planta a nivel comercial por fuera de su lugar de origen, ha llegado a convertirse en la especie de eucalipto más plantada en regiones templadas a nivel mundial con un área plantada cercana a los 2'300.00 ha (Potts *et al.,* 2004). En Colombia, el *E. globulus* es una de las especies maderables más plantadas antecedida por *Eucalyptus grandis y Pinus patula.* La ciudad de Bogotá es el principal centro de consumo de madera en Colombia. De las especies forestales cultivadas en la región cundiboyacense, el *E. globulus* (Labill.) abastece este mercado maderero en gran medida. La importancia de la madera de esta especie radica fundamentalmente en la producción de pasta de papel, la transformación para postes de cableado eléctrico y telefónico, fabricación de tableros, el desenrollado, y la serrería entre otros. Esta madera también se destaca por contar con alto porcentaje de celulosa, 60% aproximadamente, así mismo, su contenido de lignina es menor, 19,7%, si se compara con otras especies del mismo género (Pinto *et al.,* 2003). Dichas características hacen que la especie sea ideal como materia prima para la industria papelera (Rodríguez &Torres; Foelkel (En Igartúa *et al.,* 2002).

Los proyectos de establecimiento de plantaciones comerciales para abastecer la creciente demanda de madera, necesitan suficiente material vegetal de alta calidad genética con el fin de alcanzar niveles de producción competitivos. Por este motivo, una de las actividades fundamentales en los programas de mejoramiento genético de especies forestales es la instalación de huertos semilleros. Diferentes actores del sector forestal del país como el INDERENA, CONIF, Smurfit Kappa Cartón de Colombia S.A., Ministerio de Agricultura, entre otros, han desarrollado estrategias para obtener plantaciones más productivas a partir del apoyo a proyectos de mejoramiento genético forestal sin embargo el país solo cuenta con un huerto semillero de *Eucalyptus globulus* (Labill.) en producción.

El INDERENA en 1983 instaló el huerto semillero de *Eucalyptus globulus* (Labill.) del Parque Regional La Florida ubicado en el municipio de Cota Cundinamarca. Este huerto semillero, único en Colombia, conformado por 106

familias procedentes de Australia y 52 colectadas en Colombia (Arias y Castillo, 1995), ha sido objeto de evaluaciones fenotípicas a los tres, 11, 17 y 23 años obteniéndose información sobre el crecimiento, medido por variables como altura, área basal y volumen comercial de madera, adicionalmente en 1993 se evaluó la variable densidad de la madera (Salas y Salazar 2007).

A partir de los resultados de los estudios de evaluación morfodendrológica se asumió la existencia de una base genética estrecha entre las familias colombianas (Arias y Castillo, 1995). Lo anterior, ha sido explicado por los antecedentes acerca de la introducción de la especie en Colombia donde las semillas para la propagación de *E. globulus* (Labill.) se introdujeron al país en una sola época hacia el año 1865, (Venegas 1989) por tal motivo se ha estimado que las plantaciones a nivel nacional, en su gran mayoría, son originadas de esta única introducción.

Este estudio buscó conocer la diversidad genética en un huerto semillero clonal, a través del estudio de parámetros obtenidos por análisis molecular basado en marcadores microsatélites, con el propósito de complementar la caracterización de genotipos destacados por sus atributos para la industria maderera. El análisis de los genotipos, con marcadores moleculares, permite evaluar la diversidad genética sin considerar el efecto ambiental. Por tanto, ahora es posible el conocimiento del componente genético de diversidad, tanto de los genotipos de mayor productividad procedentes de Australia como los de nuestro país. Esta estrategia de caracterización básica, contribuye a la planificación de posteriores etapas de mejoramiento genético. En la evaluación se usaron trece marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs), usados anteriormente por Thamarus *et al*., (2002) en la construcción de un mapa de ligamiento genético de *E. globulus*. La población de estudio cuenta con 25 genotipos de los cuales 14 son de Australia y 11 de Colombia. Estos genotipos conforman el huerto semillero clonal El Salitre establecido a partir de material originario del huerto semillero del Parque La Florida.

Los resultados mostraron que la heterocigosidad esperada fue He: 0,608 y el número promedio de alelos Na: 4,9 valores inferiores a diferentes reportes para la especie. Así mismo, se encontró que no existe similitud genética entre los genotipos del huerto, mientras que la divergencia genética entre las poblaciones de Australia y Colombia es poco significativa.

Este es el primer estudio hecho en Colombia basado en un análisis molecular, que permite conocer el estado de la diversidad de los recursos genéticos de *Eucalyptus globulus* (Labill.) del país y que ofrece recomendaciones estratégicas para su manejo dirigidas al mejoramiento genético.

1. Objetivos

1.1 Objetivo General

Conocer la diversidad genética de los genotipos de *Eucalyptus globulus* (Labill.) del huerto semillero clonal "El Salitre", mediante el empleo de marcadores moleculares tipo microsatélites (SSRs), con el propósito de aportar información que permita programar estrategias para el manejo genético de este germoplasma en programas de mejoramiento.

1.2 Objetivos Específicos

1. Validar el uso de marcadores SSRs en la evaluación de la diversidad genética de genotipos de *Eucalyptus globulus* (Labill.).
2. Estimar las relaciones de distancia genética entre los genotipos analizados.
3. Plantear estrategias de manejo del germoplasma con fundamento en los resultados de diversidad genética de los materiales estudiados.

2. Revisión de Literatura

2.1 La producción forestal de *Eucalyptus globulus* (Labill.)

Eucalyptus globulus (Labill.) es una especie forestal usada en la producción maderera cuyo destino principal es la industria de fabricación de papel. A nivel internacional es conocido como *blue gum eucalyptus* también se le conoce como *Tasmanian blue gum* (Skolmen & Ledig, 1990). *E. globulus* presenta distribución natural en Australia específicamente en Tasmania, Victoria y Nueva Gales del Sur, entre los 31º y los 43º latitud sur, su amplia expansión natural le ha conferido una variación genética espacial significativa, en sus características reproductivas. *E. globulus* hace parte de cuatro taxones con estrecha relación genética, *globulus, bicostata, maideni* y *pseudoglobulus*, a los cuales se les ha dado diversas clasificaciones taxonómicas, como subespecies de acuerdo con Kirkpatrick en 1974 o como especies de acuerdo con Brooker en 2000. Estos taxones en sus caracteres morfológicos son diferentes y tienen distribución geográfica específica, aunque se encuentran poblaciones con características morfológicas intermedias que comparten zonas geográficas comunes (Potts *et al.,* 2004). La subespecie *globulus* se encuentra confinada en su mayoría a la costa sureste de Tasmania, en ciertas islas en el estrecho de Bass al norte de Tasmania en el Cabo Otway y el Promontorio de Wilson al sur de Victoria, en Australia (Skolmen & Ledig, 1990).

Algunas de las condiciones ambientales de aquellas regiones a donde la especie ha sido introducida, son diferentes a las del área de distribución natural. En la zona de origen se encuentra entre 0 a 1.100 msnm, mientras que por ejemplo en Colombia la especie se adaptó a zonas entre los 2.000 y 3.000 msnm, con

periodos secos hasta de tres meses y precipitaciones anuales entre 500 y 1.500 mm. Es por esto, que la especie se ha adaptado a zonas de vida como las del bosque seco montano bajo Bs-Mb, en los departamentos de Boyacá, Caldas, Cauca, Nariño y Cundinamarca (Llanos y Flórez, 2000).

Eucalyptus globulus (Labill.) es la especie maderera mas importante en regiones templadas del mundo, Tibbits *et al*., (en: Jones, Steane, Potts, & Vaillancourt, 2001). En 2004 se estimó que las plantaciones a nivel mundial cubren un área cercana a 2,3 millones de hectáreas; entre las regiones con mayor área plantada se encuentra la península Ibérica con 1,2 millones de ha, Australia con 350.000 ha, por su parte en Suramérica se destaca Chile con 232.000 y Uruguay con 200.000 ha (Potts *et al.,* 2004).

La industria forestal ha mostrado especial interés en *E. globulus* por la densidad de su madera y rápido crecimiento, Dutkowski y Potts (en: Jones, Steane, Potts, & Vaillancourt, 2001). Los programas de mejoramiento que han procurado optimizar el crecimiento y la calidad de la madera se han llevado a cabo en Argentina, Australia, Chile, China, Portugal y España.

El uso preferencial de *E. globulus* en la industria de fabricación de papel radica en la relación entre el contenido de lignina (19,7%) y celulosa (60%) de su madera, esta propiedad hace que la especie sea valiosa para la producción de pasta celulósica de fibra corta. Adicionalmente, su madera es de color más claro frente a otras especies de *Eucalyptus sp*, por esto requiere menos utilización de productos químicos para el blanqueamiento de la pulpa. Por contener menor porcentaje de lignina, la cantidad de taninos es también reducida, lo que significa menor consumo de energía, mayor rendimiento de cocción y por tanto mejor obtención de pasta celulósica.

El área plantada con esta especie en los últimos años en Colombia ha descendido, por lo que se ha requerido el aumento en las importaciones para el abastecimiento de esta madera, principalmente para la producción de postes

para telefonía y electrificación. De acuerdo con Rocha (2007), el comercio anual de madera de eucalipto en los departamentos de Boyacá, Cundinamarca, y en la ciudad de Bogotá es cercano a los 235.368 m^3. En promedio, un metro cúbico de madera en estas tres regiones se paga al productor a US$ 70 Rocha (2007). Entre los principales sectores consumidores de madera de eucalipto en Colombia están: la industria (pulpa papel y cartón), la fabricación de estibas y embalajes, la floricultura, la construcción, la minería y la transformación de postes para la energía eléctrica.

2.2 El mejoramiento genético forestal y los estudios de diversidad

Los programas de mejoramiento genético forestal en diferentes especies tienen sus orígenes hacia la década de 1950. Las poblaciones domesticadas en muchos casos están distanciadas genéticamente de sus poblaciones silvestres apenas una o dos generaciones. Las poblaciones naturales de todas las especies son indispensables tanto para mantener el ecosistema como para conservar la diversidad de los genes. Esta cercanía generacional de las plantaciones frente al bosque natural representa una gran ventaja, puesto que significa que las posibilidades de selección y mejoramiento siguen siendo amplias.

La variación genética es la base para el mejoramiento de los árboles, es decir que la única posibilidad que tiene el hombre para propiciar el mejoramiento genético es la indefectible presencia de variabilidad (Ipinza, 1998; Butcher & Southerton, 2007). Por lo tanto, una estrecha base genética tiene repercusiones drásticas en la disminución del rendimiento de la producción maderera. Butcher & Simons (en Butcher *et al*., 1999).

En las etapas tempranas de domesticación, el monitoreo de la diversidad resulta sumamente importante en poblaciones forestales pues permite reconocer y evitar problemas en el futuro como consecuencia del aumento de la endocría. Mientras más diferencias existan entre los individuos de una población, esta tendrá mayor oportunidad de resistir los constantes cambios de la naturaleza. Igualmente, las

poblaciones forestales con escasa diversidad genética no podrán hacer frente a las demandas industriales y comerciales, que son cada vez más dinámicas.

El conocimiento de la diversidad genética, en programas de mejoramiento en especies forestales, permite el control de los efectos diferenciales en la productividad, que se obtienen como resultado de la endogamia, las cruzas consanguíneas y el cruzamiento entre individuos no relacionados. Para desarrollar un programa de mejoramiento genético es necesario conocer y mantener la diversidad genética de los materiales vegetales, de este modo se pueden abrir posibilidades para dar manejo genético a caracteres forestales de interés, como resistencia a plagas y a enfermedades, adaptabilidad a factores bióticos y abióticos extremos y productividad entre otros.

A raíz del reconocimiento de la importancia de estos aspectos se han desarrollado diversos estudios de variabilidad genética utilizando marcadores moleculares, los cuales permiten investigar los niveles de variabilidad en poblaciones de mejoramiento y producción para estimar el nivel de divergencia entre individuos. Estos estudios resultan provechosos en términos de conservación, pre-mejoramiento y manejo racional del material vegetal en muchas especies forestales (Marcucci *et al*., 2005). Según Butcher *et al*. (1999), si se quiere programar debidamente la selección, mejora genética y conservación de árboles forestales es indispensable generar información fidedigna acerca de la distribución de la variación genética, la cual se puede conocer a través de la medición de caracteres morfológicos y métricos o usando técnicas de marcadores moleculares.

En el proceso de cuantificación de la variabilidad genética en una población de mejoramiento se miden frecuentemente varios atributos. Para tal efecto, se pueden medir variables continuas (datos de madurez, volumen, fenología), datos biométricos discretos (resistencia a pestes, color, forma) y datos discretos generados por marcadores moleculares como los AFLP (*Amplified Fragment*

Length Polymorphism) y los microsatélites, (-SSR-*Simple sequence repeat*) entre otros (Marcucci, 2005).

2.3 Mejoramiento de *Eucalyptus globulus* (Labill.) en Colombia

De acuerdo con Arismendi (en Venegas 1989), la especie *E. globulus* fue introducida en Colombia por medio de semillas de origen desconocido entre 1864 y 1866. Venegas (1989) afirma que posiblemente la llegada al país de la especie fue antecedida por la llegada a otros países en Suramérica como Chile en 1863 y Ecuador en 1865 y de estos países se habría introducido a Colombia. También sugiere que dado el tamaño promedio de los frutos de 1,82 cm la procedencia original puede ser del Este o Sur este de Tasmania.

En Colombia por lo general, la obtención de semillas para la producción de material de vivero con destino a la instalación de plantaciones de *E. globulus*, se realiza a partir muy pocos árboles. Estos árboles son aquellos que han alcanzado la edad adecuada para la obtención de madera rolliza, principal uso dado a la especie en nuestro territorio. Lo anterior, sugiere que desde la época de la introducción de la especie al país han transcurrido por lo menos 14 generaciones, periodos de adaptación que han propiciado la formación de razas locales, con estrecha base genética y alto grado de consanguinidad (Venegas 1989).

Las plantaciones de *E. globulus* en Colombia aunque cuentan en general con buen crecimiento volumétrico son fenotípicamente bastante heterogéneas. En una misma plantación se encuentran, árboles destacados por su buen desarrollo e individuos de pobre crecimiento y fuste torcido, entre otras características no deseables en una plantación comercial. Esta situación ha motivado, que a partir de la década del 80, se fomenten iniciativas para al mejoramiento genético de las plantaciones de *E. globulus* en el país (Venegas 1989).

En 1983 el Instituto Nacional de los Recursos Naturales Renovables y del Ambiente (INDERENA) instaló un huerto semillero de plántulas de polinización abierta para *E. globulus* en la Estación Forestal “La Florida” (Parque Regional La

Florida) ubicado en el municipio de Cota Cundinamarca. El objetivo fue producir semilla mejorada genéticamente para aumentar la productividad de las plantaciones, además de servir como área para la conservación de germoplasma de la especie en el país. Dicho huerto está conformado por 158 familias y reúne la mayor fuente de variabilidad genética de *E. globulus* en Colombia.

El huerto semillero fue instalado con dos fuentes principales de semilla. La primera, proveniente de Tasmania (Australia), donde la colecta de semilla se realizó en 15 lugares que cubren la mayor parte del área de distribución natural de *E. globulus;* la selección total fue de 106 individuos. La segunda fuente proviene de Colombia, donde fueron seleccionados 52 árboles de plantaciones comerciales en 25 municipios de los departamentos de Cundinamarca, Boyacá y Nariño. En total se obtuvo semilla de 158 árboles, la progenie de cada árbol constituye una familia de hermanos medios, denominada así, porque se obtiene a partir de polinización abierta, es decir que se conoce el origen del progenitor femenino o árbol madre del que se cosecha la semilla y se desconoce el origen del polen donado por los progenitores masculinos.

En el huerto La Florida las familias de la 1 a la 106 son de procedencia australiana y de la 107 a la 158 son de procedencia colombiana. Los árboles hermanos medios de cada familia están repartidos en repeticiones o bloques del I al IX; inicialmente fueron plantados cinco árboles de cada familia por cada bloque. A partir de evaluaciones fenotípicas, se eliminaron los individuos de crecimiento indeseable hasta dejar el mejor árbol de cada familia en cada uno de los nueve bloques (Venegas 1989).

Varias investigaciones han permitido dar continuidad a la evaluación fenotípica de las familias del huerto, entre ellas se encuentran las siguientes: Evaluación de la del huerto a los tres años de edad (Álvarez y Orjuela, 1985); a los 11 años de edad (Arias y Castillo, 1995); a los 17 años de edad (Llanos y Flores, 2000) y a los 24 años de edad (Salas y Salazar, 2007). En 2008 se instalaron ensayos de progenie en Firavitova, Tuta y Santa Rosa de Viterbo en el departamento de

Boyacá, con semillas de algunas familias del huerto semillero La Florida y con semillas procedentes de Chile (Salas y Salazar, 2007).

Estas evaluaciones fenotípicas dieron lugar a la selección de 40 familias teniendo en cuenta la variable producción de volumen comercial de madera. La clonación de los árboles fenotípicamente superiores de estas familias dieron lugar en 2007 a la conformación del Huerto Semillero Clonal (HSC) ubicado en la Finca "El Salitre", kilómetro siete de la vía que conduce de Bogotá D.C. al municipio de Choachí, Cundinamarca (Angulo, 2010).

Para el establecimiento del huerto "El Salitre" se cosechó semilla de los individuos seleccionados de cada una de las 40 familias, para la producción de plántulas. A este material se le injertó una púa proveniente del ápice de la copa de los genotipos superiores de cada familia. Esta clonación se llevó a cabo mediante el injerto de patrones con hendidura terminal, logrando al final la clonación de sólo 36 genotipos superiores, uno de cada familia (Salas y Salazar, 2007). Al cabo de cinco años de la instalación del huerto han sobrevivido 25 genotipos de los 36 inicialmente clonados.

Como fuente para el abastecimiento de semilla, el huerto del Parque La Florida, sigue siendo la única zona con genotipos superiores en estado de producción de semilla genéticamente mejorada para la especie *E. globulus* en Colombia, a partir de la cual se podría obtener material vegetal para establecer proyectos de reforestación comercial con plantaciones más productivas y homogéneas.

2.4 Marcadores morfológicos y moleculares

Los marcadores morfológicos son características fenotípicas de identificación sensorial que fueron inicialmente utilizados en investigaciones de genética y mejoramiento al ser controlados por genes asociados a caracteres morfológicos que se podían reconocer visualmente con facilidad. Dichos marcadores contribuyeron en gran manera al desarrollo teórico del análisis del ligamiento y a la construcción de los primeros mapas genéticos en especies como el tomate y el

maíz. La identificación de marcadores morfológicos ligados a genes de importancia económica no era muy común, lo cual limitaba su uso en programas de mejoramiento. Además, la disponibilidad de marcadores morfológicos era muy restringida a unas cuantas especies vegetales. Sin embargo, continúan siendo útiles en la identificación de materiales, aunque tienen algunos limitantes como: un número reducido de marcadores disponibles en cada población, un bajo nivel de polimorfismo, alteraciones fenotípicas por el ambiente y bajo control poligénico (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares funcionan como señales de las distintas regiones del genoma que permiten evidenciar variaciones o polimorfismos en la secuencia del ADN entre dos individuos. Los marcadores de ADN en la genética vegetal son de gran utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, mapeo, selección asistida y clonación genética. Los marcadores empleados para estos estudios deben ser altamente polimórficos o variables dentro y entre especies, de herencia mendeliana, preferiblemente, codominantes, de fácil identificación y análisis simple (Picca *et al*., 2004). La implementación masiva de marcadores basados en ADN ha permitido descubrir y analizar varias clases de secuencias repetitivas de ADN denominadas microsatélites.

Los microsatélites son una rica fuente de polimorfismo genético que hace posible la obtención de un número ilimitado de marcadores moleculares con altos niveles de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Acuña *et al.*, 2002).

El empleo de marcadores moleculares es útil para cuantificar con precisión la variabilidad genética de huertos semilleros clonales (Marcucci *et al*., 2005). También se usan en la estimación de la amplitud de la base genética evolutivamente neutra en huertos semilleros diseñados. Los marcadores moleculares son una herramienta valiosa dado que la estimación de la diversidad genética por este método es más precisa que la estimación obtenida por marcadores morfológicos y cubre de forma amplia el genoma.

La comparación de las principales características de los marcadores morfológicos y los marcadores moleculares permite destacar a continuación las siguientes diferencias, ventajas y desventajas:

Los marcadores morfológicos sólo se pueden identificar en plantas enteras o adultas. Mientras que los marcadores moleculares sirven para caracterizar el genotipo de individuos a partir de células o tejidos en cualquier etapa del desarrollo de la planta siempre y cuando la cantidad de ADN a obtener sea suficiente. Esta característica permite acelerar el proceso de selección y recombinación de individuos con características deseables y por tanto reducir el tiempo para completar una generación de mejoramiento de especies forestales (Picca *et al*., 2004).

En relación a los efectos fenotípicos, los marcadores moleculares en general, son neutros, con efecto epistático o pleiotrópico mínimo o nulo. Además, estos marcadores muchas veces restringen el desarrollo normal de la planta (albinos, mutantes clorofíticos) y su control genético puede ser afectado por genes que controlan otros caracteres, dificultando la identificación de los genotipos de interés (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Para la construcción de mapas genéticos se usan tanto marcadores morfológicos como moleculares, sin embargo construir mapas a partir de marcadores morfológicos requiere mucho esfuerzo y planificación, puesto que el número reducido de marcadores por linaje restringe la cobertura total del genoma. El limitado polimorfismo de estos marcadores, generalmente hace que se deba recurrir a un gran número de cruzamientos para el estudio de ligamiento genético. En cambio, en el caso de los marcadores moleculares es posible estudiar un gran número de *loci* polimórficos, cuyos alelos en poblaciones segregantes de cruzamientos específicos, facilita la construcción de los mapas genéticos. El nivel de polimorfismo de estos marcadores es habitualmente alto para cada locus estudiado (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Picca, *et al*., 2004).

2.5 Marcadores basados en la amplificación de microsatélites

Los marcadores tipo microsatélites son definidos como regiones genómicas con alta variabilidad, conformadas por pequeñas secuencias de uno a cuatro nucleótidos adyacentes repetidos a lado y lado (tándem) (Picca *et al*., 2004). Los microsatélites SSR son frecuentes en genomas eucariontes y son considerados como los marcadores más polimórficos, ya que forman *loci* genéticos con mayor nivel de polimorfismo que los *loci* hipervariables resultantes de otro tipo de marcadores. Los SSRs son ideales para la elaboración de mapas genéticos, dado el tamaño diminuto de los segmentos polimórficos generados identificados vía PCR. Estos marcadores son usados con frecuencia para la identificación de genotipos en cultivos anuales y algunas especies forestales. El nivel elevado de información de polimorfismo, dada la expresión codominante y el multialelismo, es una de las ventajas de los SSRs (Butcher *et al*., 1999; Acuña *et al*., 2002; Picca *et al*., 2004).

Los microsatélites SSRs son importantes en la definición de genotipos individuales y en estudios de flujo de genes en especies forestales, ya que por su gran variabilidad y por ser codominantes permiten distinguir con facilidad los individuos heterocigotos de los homocigotos. En los programas de domesticación, los microsatélites permiten la identificación de germoplasma y la construcción de mapas de ligamiento que permiten el mapeo de rasgos de interés a través de la localización de QTL (*Quantitaive Trait Loci*) útil en selección asistida (Butcher *et al*., 1999).

2.6 Investigaciones con marcadores moleculares en *Eucalyptus globulus* (Labill.)

En 2001, Jones, R., D. A., Steane, B. M. Potts, y R. E. Vaillancourt, en su estudio denominado *Microsatellite and morphological analysis of Eucalyptus globulus populations,* usaronocho marcadores microsatélites para evaluar las afinidades

genéticas entre la procedencia Jeerelang del Sur- este de Victoria, Australia y las subespecies *bicostata, globulus* y *pseudoglobulus*. En el estudio también evaluaron 12 características morfológicas entre las que se encuentran: número de cápsulas por umbela, longitud y ancho máximo de la hoja, longitud de pedúnculo, longitud del pedicelo, altura del disco, diámetro de la cápsula, número de costillas en la cápsula, longitud de lámina excluyendo el pecíolo. Los resultados dieron lugar a la caracterización de los niveles de diversidad y endogamia.

En la extracción de ADN se usó un espécimen de herbario y tejido de hojas de 154 árboles adultos del Suroriente de Victoria y del Este de Tasmania, en estado silvestre. El análisis morfológico concluyó que la procedencia Jeerelang es intermedia entre las subespecies *bicostata, globulus y pseudoglobulus*, con algunos individuos cercanos principalmente a *globulus* y *pseudoglobulus*, mientras que el análisis con microsatélites demostró que Jeerelang tiene más afinidad con *globulus* con la cual está más cercana geográficamente. Por otra parte, las especies de *globulus* de Tasmania y Victoria que, morfológicamente son similares, al parecer son diferentes a nivel molecular. Los resultados mostraron que los ocho *loci* fueron altamente polimórficos con 16 a 30 alelos por locus. El alto nivel polimórfico se mostró también en el promedio de Heterocigosidad observada Ho=0,62 y Heterocigosidad esperada He=0,82. De las poblaciones estudiadas ninguna se destacó por tener un nivel de diversidad comparativamente alto frente a las demás.

Thamarus *et al.,* (2002), en su estudio *A genetic linkage map for Eucalyptus globulus with candidate loci for wood, fibre, and floral traits,* construyeron un mapa de ligamiento genético en la especie *E. globulus* mediante el uso marcadores codominantes, con el fin de entender la base molecular cuantitativa de genes ESTs candidatos involucrados en producción de enzimas para síntesis de lignina, genes para la biosíntesis de polisacáridos de la pared celular para fibra y genes de desarrollo floral.

El estudio de Thamarus *et al*., (2002) se basó en la segregación de 249 loci codominantes de una población compuesta por 148 progenies resultado del cruzamiento de parentales masculinos de Tasmania y femeninos de King Island. El mapa contenía 204 marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) incluyendo 31 específicos para cambium expresados en secuencias EST (*Expressed sequence tag*), y 14 genes con funciones conocidas, 40 SSRs y cinco isoenzimas. Noventa y ocho loci (39%) segregaron en ambos padres, estos fueron usados para combinar los mapas parentales en un mapa integrado. La distancia total del mapa fue de 1.375 cM, con promedio de intervalo de 6 cM. Este mapa fue usado para mapear QTL para producción de madera, de fibra y otras características en la especie. Los microsatélites detectados reportaron gran número de *loci* informativos (60%). Los mapas de *E. globulus* dieron un gran nivel de confiabilidad en la asignación de *loci* para los grupos de ligamiento.

En Argentina, desde 1991, se inició la exploración de la variabilidad genética de individuos seleccionados para poblaciones de mejoramiento de tres especies de *Eucalyptus sp.* Para valorar la diversidad genética de muestras en poblaciones y comparar la variabilidad de tres huertos semilleros ya diseñados, se utilizaron marcadores moleculares AFLP y SSR. Los análisis de datos de selecciones locales y de ensayos de procedencias permitieron detectar las principales fuentes de variación de los materiales, evaluar la diversidad molecular de huertos semilleros, proponer estrategias de selección y determinar posibles orígenes de las razas locales de *E. globulus* (Marcucci, 2005). Mediante el uso de 213 AFLP y seis SSRs se buscó explorar la diferenciación genética entre el HSC y las razas geográficas locales. Se determinó que la diferencia genética no fue significativa, lo cual confirma los resultados de estudios anteriores respecto a heterocigosis y riqueza alélica (Marcucci *et al*., 2005).

3. Materiales y metodos

En esta investigación se estudió la diversidad genética en *E. globulus*, empleando marcadores microsatélites, como estrategia, para identificar pequeños polimorfismos en diferentes loci, cubrir distintas regiones del genoma, distinguir el estado de genotipos en condición de homocigosis o heterocigosis. Con los resultados se realizaron los análisis basados en frecuencias alélicas para hallar la heterocigosidad, el polimorfismo, la riqueza alélica, estadísticos F, el equilibrio Hardy-Weinberg, distancia genética de Nei. Mediante el análisis basado en distancias se halló el índice de similitud de Jaccard para la construcción del dendrograma de afinidad genética entre genotipos y el AMOVA.

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal Antonio Angarita Zerda de la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.

3.1 Material vegetal

El estudio fue realizado con material vegetal del Huerto Semillero Clonal (HSC) de *E. globulus* “El Salitre”, que está compuesto por 25 genotipos seleccionados fenotípicamente, obtenidos y propagados de forma clonal. A cada genotipo diferente se le denomina *ortet* y para cada uno existe diferente número de copias idénticas o clones denominadas *ramets*, las cuales conforman el grupo de 56 individuos del huerto.

En esta investigación fueron analizados los 25 genotipos mencionados, (14 de Australia y 11 de Colombia) los cuales no presentan relaciones directas de

parentesco genético. Se tomó follaje joven del ápice de la copa, con pocos días de crecimiento, este material vegetal fue identificado en el análisis molecular de acuerdo a la numeración establecida en el huerto.

3.2 Extracción de ADN

El tejido vegetal fresco descrito anteriormente, se maceró en nitrógeno líquido, la extracción de ADN se realizó de acuerdo con el protocolo A, descrito por Ribeiro y Lobato (2007) que presenta una modificación del clásico protocolo de Doyle y Doyle (1990) (anexo 1). La concentración del ADN se verificó de forma cualitativa mediante comparación con patrones del fago λ, visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% con tinción por bromuro de etidio. El ADN se ajustó a una concentración final de 30ng/µl para realizar el análisis de los microsatélites.

3.3 Genotipificación

Para el análisis molecular se emplearon 21 marcadores microsatélites de los 40 usados por Thamarus *et al.,* (2002), en la construcción de un mapa de ligamiento en *E. globulus* (Labill.). Los 21 microsatélites se seleccionaron teniendo en cuenta que mapearan en los 11 grupos de ligamiento, con el propósito de cubrir los 11 cromosomas de la especie. Fueron seleccionados por parejas de modo que cada marcador mapeara en los extremos de los 11 grupos de ligamiento. Esto con el fin de asegurar que tales parejas de microsatélites, después de diferentes eventos de recombinación genética hubieran segregado de forma independiente por no estar ligados y que los resultados de esta investigación puedan ser útiles para posteriores trabajos que pretendan hacer selección asistida con marcadores, siguiendo el enfoque de construcción de mapas genéticos.

En la PCR (*Polimerase Chain Reaction*) se usó un volumen final de reacción de 15 µl y para cada marcador se estandarizaron las concentraciones de $MgCl_2$ y

temperatura de *annealling* usando cinco genotipos (5, 18, 99, 127, 146, 156). La PCR fue realizada de acuerdo con el protocolo usado por Thamarus *et al.,* (2002): 30 ciclos así: temperatura y tiempo de denaturación, 95°C durante 15 segundos, temperatura de *annealing* de 55°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, y una extensión final de 8 min a 72°C. Los fragmentos amplificados fueron visualizados en geles de agarosa al 1% y las bandas se compararon con marcador de peso Invitrogen de 100 pb.

Obtenidos los resultados de estandarización de las condiciones de amplificación se analizaron los marcadores seleccionados (tabla 1) en los 25 genotipos. Los productos de la amplificación fueron analizados y visualizados mediante electroforesis vertical. La electroforesis se realizó durante de 1 hora 15 min, en geles denaturantes de poliacrilamida al 4% y urea 5M. Para identificar el tamaño de los productos de PCR se usaron patrones de peso molecular ADN de10 pb y 50 pb.

La tinción y el revelado se realizaron mediante inmersión en solución fijadora de ácido acético al 10% por 20 min, tinción en solución de nitrato de plata por 30 min, revelado con solución de carbonato de calcio por 15 min, e inmersión en solución de ácido acético al 10% por 20 min.

Tabla 1: Marcadores microsatélites seleccionados para el análisis molecular en el estudio de diversidad de genética de *E. globulus.*

Grupo de ligamiento	Marcador	PRIMERS		Accesión Genbank
		Forward	Reverse	
1	Eg 126	GAGGTCGAACGCAAGATAGC	TCTTATGGGGACATCAAGCC	EU699761
	Es 076	AATGCTGCTGTAGACGATGC	AAGACAAATCAAGCAAGTCAGC	EU694396
2	En 014	CCCAAGAAATCACCGAAAAC	GCTGACGGAGGAGGAGATGT	
	Eg 061	AAAACGAACCACCCTTCCTC	CCTTTTGATGGGACTTGGTG	EU699745
3	Eg 024	CGACGTCACAGTTATGTGGG	CCTGAGCTTTTGAATACGGG	EU699743
	Eg 099	CTCATCAGCCTCCGAAACAC	GAAAGGAGGGACCTTTGAGG	EU699757
4	Eg 008	AGGTTTATGAGATCAACCCAGG	GGTCGTTTATTCCTTCTCACTCTG	EU699738
	Eg 096	CCAGGGAAAACAATTCAAGC	GAGCGACAAACCCAAGTTTC	EU699755
5	Eg 089	TTCCCAATTGCTCTTTCCTG	CAGCAAGCTCTGGAAGAAGG	EU699752
	Eg 115	TGAACCGAACCCATCTTTTC	AGCATTGAAAGAGAAAGGCG	
6	Eg 015b	GAAGCCATGCGCATACTAATC	TCTGAGGAATGGGTGATGTG	EU699739
	En 016	TTTCCTCTTCACGCACTCG	CTCCCGGGCCCTGTAC	
7	Eg 134	TCGTTTCTACCGATCTTCCC	ACTGTAGTCCGAGCGAGCAG	EU699764
	En 006	GAGCTGGAAATGGAGCAGAC	TCAATTTTTGCCTCTCCCC	
8	Eg 131	CCCACCGAGAAGATGTACTG	ATCTCGTCCGAAACACCAAG	EU699763
	Eg 094	TGATCGTTTGGAGAGTGGTG	GCTGGTGCTCAGTTCCTCTC	EU699754
9	Embra 5	ATGCTGGTCCAACTAAGATT	TGAGCCTAAAAGCCCAAC	BV682004
10	Eg 023	AAAATCCCGAGGAAAGATG	TCTGGTTTCATCAGCACCTG	EU699742
	Es 115	ACAATGAAGGATGCAAGAAGC	TATGGCTAACTTTTAGCTGGAACA	
11	Eg 030	TGGTAACCTCTCGGGTCTTG	CACTCGTCCTCTTCCCTGAC	
	Eg 128	TTTTGAAGGTAGATGAGGGG	CCATGAAAACCAGCAAAATATG	EU699762

Los códigos de los microsatélites Eg, En, Es, Embra, corresponden a marcadores previamente evaluados en las especies *E. globulus, E. nitens, E. sieberi*. y *E. grandis.* (Thamarus *et al.,* 2002).

4. Análisis Estadístico

El fenotipo molecular obtenido por los SSRs fue transformado en una matriz de datos binarios de 1 (presencia) y 0 (ausencia). Con estas matrices se calcularon las distancias entre individuos. La medida de similaridad utilizada fue el coeficiente de Jaccard. Posteriormente, a partir de estas distancias encontradas se construyó un dendrograma (diagrama de árbol) de ligamiento uniendo en grupos (*cluster*) los genotipos que resultaron similares genéticamente. Los grupos se unen a otros dependiendo del nivel de similaridad, hasta que todas las muestras analizadas son incluidas en un grupo individual. Los análisis de grupos se realizaron mediante el algoritmo *Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Averages* (UPGMA), paquete estadístico DARwin 5. Para el análisis de frecuencias alélicas se usó el software GenAlEx 6.5b3Rod (Peakall y Smouse 2012).

5. Resultados

5.1 Genotipificación

De los 21 marcadores moleculares microsatélites usados en el estudio, fue posible amplificar 13 marcadores. En la tabla 2 se muestran las condiciones de temperatura de *annealling* y concentración de cloruro de magnesio bajo las cuales se obtuvieron los diferentes amplicones.

Tabla 2: Marcadores microsatélite amplificados y condiciones de amplificación en la especie *E. globulus.*

Locus	Grupo ligamiento	Motivo repetición	Temperatura annealling	Mg^{2+}(mM)
Eg 126	1	$(GAA)_8$	55 ºC	1,5
Eg 061	2	$(GAA)_9(GAT)_7$	56 ºC	1,5
Eg 024	3	$(CT)_8$-$(CT)_{10}$	55 ºC	1
Eg 099	3	$(CTT)_{11}$	56 ºC	1,5
Eg 008	4	$(CTT)_8$	57 ºC	1,5
Eg 096	4	$(GAA)_5(GAG)_8(GAA)_5$	55 ºC	1,5
Eg 089	5	$(CTT)_9$	57 ºC	1,5
Eg 115	5		55 ºC	1,5
Eg 134	7	$(TC)_{10}(CTT)_{10}$	55 ºC	1,5
Eg 094	8	$(GAA)_3$	55 ºC	1,75
Eg 131	8	$(TTC)_{11}$	56 ºC	1,5
Eg 023	10	$(CTT)_8(AGCCG)_4(AG)_5$	56 ºC	1,5
Eg 030	11		56 ºC	1,5

5.2 Frecuencias alélicas

Los 13 marcadores que se muestran en la tabla 2 fueron polimórficos con valores de frecuencia alélica entre 0,9 y 0,036. El número de alelos por locus estuvo entre dos y siete, con un valor promedio de cinco. El promedio del índice de diversidad genética (ID), también llamado heterocigosidad esperada (He) fue

0,608 al realizar el análisis de los 25 individuos del huerto semillero clonal como un solo conjunto; mientras que al evaluar la diversidad genética como dos poblaciones la australiana y la colombiana, se encontraron valores de heterocigosidad esperada promedio He 0,583 y 0,576 respectivamente.

Todos los genotipos australianos y colombianos, fueron homocigotos en al menos un locus. La tabla 3, muestra que en la población australiana los individuos homocigotos están entre 14% en el locus (Eg 096) y 78% en el locus (Eg 008). Por su parte en la población colombiana los individuos homocigotos se encuentran entre el 18% en (Eg 099) y el 90% en (Eg 023).

Tabla 3: Número de individuos homocigotos en cada locus encontrados para las poblaciones australiana y colombiana en *E. globulus.*

Locus	Homocigotos			
	Aust (N = 14)		Col (N = 11)	
Eg 008	11	79%	9	82%
Eg 023	7	50%	10	91%
Eg 024	11	77%	9	80%
Eg 030	11	79%	9	82%
Eg 061	11	75%	2	20%
Eg 089	8	57%	8	73%
Eg 094	9	64%	3	30%
Eg 096	2	14%	4	36%
Eg 099	4	29%	2	18%
Eg 115	8	60%	2	20%
Eg 126	4	29%	6	55%
Eg 131	5	38%	6	55%
Eg 134	10	71%	6	55%

La tabla 4 muestra que la heterocigosidad esperada (He) varió entre 0,196 (Eg 008) y 0,828 (Eg 131) en la población australiana y entre 0,180 (Eg 024) y 0,775 (Eg 061) en la población colombiana. Por su parte la heterocigosidad observada

(Ho) promedio en las poblaciones fue 0,445 y 0,465, esta varió entre 0,214 (Eg 008 y Eg 030) y 0,714 (Eg 099) en la población australiana y entre 0,091 (Eg 023) y 0,818 (Eg 099) en la población colombiana. Al comparar la heterocigosidad observada (Ho) con la heterocigosidad esperada (He) se encontró que en la población australiana, la Ho superó a la He en cuatro de los 13 loci analizados; por su parte en la población colombiana se presentó la misma situación en seis de los 13 loci. El promedio de los valores de He en ambas poblaciones superó el promedio de la Ho. Loci con igual Número de alelos (Na) presentaron valores diferentes de número efectivo de alelos (Ne) en ambas poblaciones.

Tabla 4: Alelos y heterocigosidad por locus en las poblaciones de Australia y de Colombia de *E. globulus*.

Locus	N		Na		Ne		Ho		He	
	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col
Eg 008	14	11	3	2	1,244	1,658	0,214	0,182	0,196	0,397
Eg 023	14	11	5	2	3,240	1,541	0,500	0,091	0,691	0,351
Eg 024	13	10	2	2	1,257	1,220	0,231	0,200	0,204	0,180
Eg 030	14	11	5	5	3,063	3,903	0,214	0,182	0,673	0,744
Eg 061	12	10	3	7	2,571	4,444	0,250	0,800	0,611	0,775
Eg 089	14	11	4	4	1,990	2,444	0,429	0,273	0,497	0,591
Eg 094	14	10	4	3	2,253	2,381	0,357	0,700	0,556	0,580
Eg 096	14	11	4	4	3,409	2,659	0,857	0,636	0,707	0,624
Eg 099	14	11	5	4	3,500	2,689	0,714	0,818	0,714	0,628
Eg 115	10	5	4	4	3,571	3,846	0,400	0,800	0,720	0,740
Eg 126	14	11	3	3	2,000	1,906	0,714	0,455	0,500	0,475
Eg 131	13	11	7	6	5,828	3,781	0,615	0,455	0,828	0,736
Eg 134	14	11	6	4	3,087	2,988	0,286	0,455	0,676	0,665
Promedio	13,38	10,31	4,23	3,85	2,847	2,728	0,445	0,465	0,583	0,576
Desv. Est.	0,331	0,458	0,38	0,42	0,334	0,283	0,061	0,073	0,054	0,050

N: Número de individuos de cada población que poseen algún alelo en el locus

Na: Número de alelos diferentes en el locus por población

Ne: Número efectivo de alelos. Ho: Heterocigosidad observada

He: Heterocigosidad esperada

En el índice de fijación (F) también llamado coeficiente de endogamia se encontraron valores promedio de 0,189 y 0,197 para la población australiana y colombiana respectivamente (Tabla 5). De los 13 marcadores, en la población australiana se encontraron cuatro marcadores con valores negativos de (F) mientras que en la población colombiana seis. Estos valores negativos muestran exceso de heterocigosidad en esos loci. Se encontraron valores de índice de fijación entre -0,091 y 0,682 en la población australiana y entre -0,032 y 0,756 en la población colombiana. En la población australiana el 30% (4 de 13) de los loci analizados presenta exceso de heterocigotos mientras en la población colombiana en el46% (6 de 13) de los loci. En la población Australiana hay dos loci (Eg 089 y Eg 099) con valores cercanos a cero mientras en la colombiana solo un locus (Eg 126). En la población australiana hay valores altos de F en cinco loci, los de mayor valor son Eg 030, Eg 061 y Eg 134; en la colombiana hay valores altos en tres locus Eg 023, Eg 030 y Eg 089.

Tabla 5: Índices de información y de fijación, He insesgada por población.

Locus	I		uHe		F	
	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col
Eg 008	0,409	0,586	0,204	0,416	-0,091	0,542
Eg 023	1,320	0,536	0,717	0,368	0,277	0,741
Eg 024	0,358	0,325	0,212	0,189	-0,130	-0,111
Eg 030	1,281	1,468	0,698	0,779	0,682	0,756
Eg 061	1,011	1,653	0,638	0,816	0,591	-0,032
Eg 089	0,938	1,053	0,516	0,619	0,138	0,538
Eg 094	0,939	0,943	0,577	0,611	0,358	-0,207
Eg 096	1,308	1,157	0,733	0,654	-0,213	-0,020
Eg 099	1,399	1,169	0,741	0,658	0,000	-0,303
Eg 115	1,314	1,366	0,758	0,822	0,444	-0,081
Eg 126	0,830	0,816	0,519	0,498	-0,429	0,043
Eg 131	1,832	1,511	0,862	0,771	0,257	0,382
Eg 134	1,381	1,184	0,701	0,697	0,577	0,317
Promedio	1,102	1,059	0,606	0,607	0,189	0,197
Desv. Est.	0,114	0,112	0,056	0,053	0,096	0,101

I: Índice de información. uHe: Heterocigosidad esperada insesgada.

F: Índice de fijación (coeficiente de endogamia)

Tabla 6: Aporte de las poblaciones australiana y colombiana a la diversidad alélica total en *E. globulus*.

Locus	Abundancia de alelos por locus	Na		Aporte proporcional de alelos por población	
		Aust	Col	Aust	Col
Eg 008	3	3	2	1,00	0,67
Eg 023	5	5	2	1,00	0,40
Eg 024	2	2	2	1,00	1,00
Eg 030	6	5	5	0,83	0,83
Eg 061	7	3	7	0,43	1,00
Eg 089	5	4	4	0,80	0,80
Eg 094	5	4	3	0,80	0,60
Eg 096	4	4	4	1,00	1,00
Eg 099	5	5	4	1,00	0,80
Eg 115	5	4	4	0,80	0,80
Eg 126	4	3	3	0,75	0,75
Eg 131	7	7	6	1,00	0,86
Eg 134	6	6	4	1,00	0,67

Na: Número de alelos.

El número de alelos por locus estuvo entre dos y siete, la tabla 6 permite comparar el aporte de alelos de cada población en cada uno de los loci. Se aprecian valores contrastantes de la proporción de alelos aportada por cada población. Los individuos australianos para los loci Eg 008, Eg 023, Eg 024, Eg 096, Eg 099, Eg 131, Eg 134 (53% de los loci evaluados) aportan la totalidad de los alelos. Solo en el locus Eg 061 se observó que la población colombiana aporta mayor riqueza alélica, en el resto de loci la población australiana contribuye en mayor medida.

Tabla 7: Heterocigosidad esperada y estadísticos F para el total de genotipos de *E. globulus*.

Locus	He total	He media	Ho media	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	Nm
Eg 008	0,319	0,297	0,198	0,332	0,379	0,070	3,344
Eg 023	0,568	0,521	0,295	0,433	0,480	0,083	2,773
Eg 024	0,192	0,192	0,215	-0,121	-0,121	0,001	405,750
Eg 030	0,770	0,709	0,198	0,721	0,743	0,080	2,892
Eg 061	0,709	0,693	0,525	0,242	0,260	0,023	10,848
Eg 089	0,624	0,544	0,351	0,356	0,438	0,127	1,714
Eg 094	0,579	0,568	0,529	0,070	0,087	0,018	13,382
Eg 096	0,713	0,665	0,747	-0,122	-0,048	0,066	3,522
Eg 099	0,688	0,671	0,766	-0,142	-0,114	0,024	10,062
Eg 115	0,760	0,730	0,600	0,178	0,211	0,039	6,083
Eg 126	0,492	0,488	0,584	-0,199	-0,187	0,009	26,645
Eg 131	0,806	0,782	0,535	0,316	0,336	0,030	8,070
Eg 134	0,684	0,671	0,370	0,448	0,459	0,020	12,240
Promedio	0,608			0,193	0,225	0,045	39,025
Desv. Est.				0,078	0,079	0,010	30,617

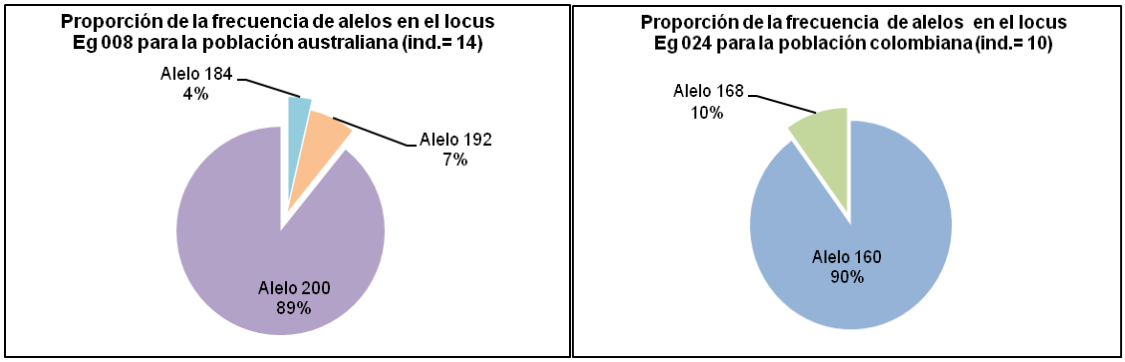
He total: Heterocigosidad esperada para el total de genotipos (25), He media: Heterocigosidad esperada promedio entre las poblaciones. Ho media: Heterocigosidad observada promedio entre las poblaciones. Fis: Coeficiente de endogamia dentro de individuos relativo a la subpoblación. F_{IT}: Coeficiente de endogamia dentro de individuos relativo al total. F_{ST}: Coeficiente de endogamia dentro de subpoblaciones relativo al total.

En la tabla 7 se observa que la He total fue de 0,608, la magnitud de F_{ST} promedio fue 0,045. Se obtuvieron valores negativos de F_{IS} y de F_{IT} en los marcadores Eg 024, Eg 096, Eg 099 y Eg 126. Aquellos loci donde se evidenció menor diferenciación entre las dos poblaciones fueron Eg 024 (F_{ST}: 0,01) y Eg 126 (F_{ST}: 0,09) por otro lado los loci que permiten hallar mayor diferenciación entres las poblaciones fueron Eg 023 (F_{ST}: 0,083) y Eg 089 (F_{ST}: 0,127).

Tabla 8: Relación entre heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada, heterocigosidad máxima esperada e índice de heterocigosidad en *E. globulus.*

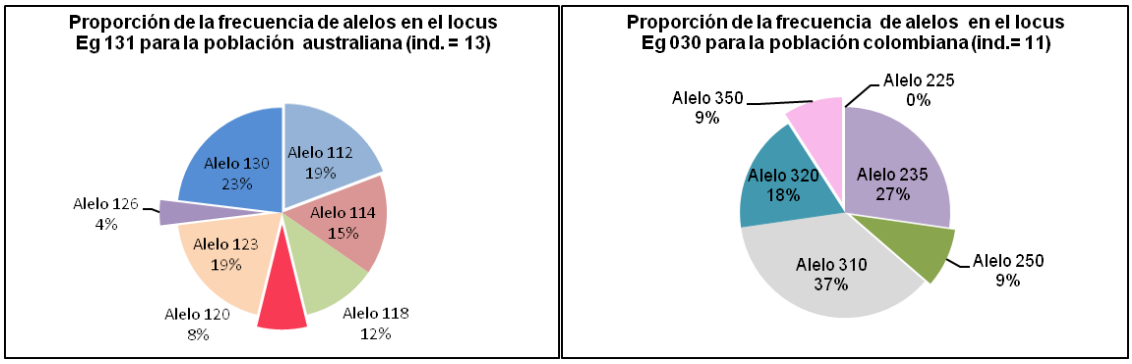
Locus	Ho		He		Heterocigosidad máxima esperada		Índice de Heterocigosidad	
	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col	Aust	Col
Eg 008	0,214	0,182	0,196	0,397	0,667	0,500	0,705	0,207
Eg 023	0,500	0,091	0,691	0,351	0,800	0,500	0,136	0,298
Eg 024	0,231	0,200	0,204	0,180	0,500	0,500	0,592	0,640
Eg 030	0,214	0,182	0,673	0,744	0,800	0,800	0,158	0,070
Eg 061	0,250	0,800	0,611	0,775	0,667	0,857	0,083	0,096
Eg 089	0,429	0,273	0,497	0,591	0,750	0,750	0,337	0,212
Eg 094	0,357	0,700	0,556	0,580	0,750	0,667	0,259	0,130
Eg 096	0,857	0,636	0,707	0,624	0,750	0,750	0,058	0,168
Eg 099	0,714	0,818	0,714	0,628	0,800	0,750	0,107	0,163
Eg 115	0,400	0,800	0,720	0,740	0,750	0,750	0,040	0,013
Eg 126	0,714	0,455	0,500	0,475	0,667	0,667	0,250	0,287
Eg 131	0,615	0,455	0,828	0,736	0,857	0,833	0,034	0,117
Eg 134	0,286	0,455	0,676	0,665	0,833	0,750	0,189	0,113

La tabla 8 muestra el índice de heterocigosidad más alto (0,705) presentado en Eg 008 en la población australiana, esto quiere decir, que en este locus la diferencia entre las frecuencias de sus tres alelos es muy marcada (figura 1a); un alelo es muy frecuente mientras los otros son muy escasos. En la población colombiana, el locus con mayor variabilidad en los valores de frecuencia de sus alelos, es Eg 024, que se comprueba por tener un valor alto en el Índice de Heterocigosidad 0,640, (figura 1b). Los marcadores que presentan menor variabilidad son Eg 131 (0,034) para la población australiana (figura 2a) y Eg 115 (0,013) para la colombiana (figura 2b); en este marcador solo hubo amplificación de secuencias en 5 de los 11 individuos de esta población, razón por la cual este valor se ve afectado. Por esta razón se considera entonces que el marcador con menor variabilidad en la población colombiana es el Eg 030.



a. **b.**

Figura 1: Proporción de frecuencias de alelos en *E. globulus*. a) En locus Eg 008 población australiana b) En locusEg 024 población colombiana.



a. **b.**

Figura 2: Proporción de frecuencias de alelos en *E. globulus*. a) En el locus Eg 131 población australiana b) En el locus Eg 030 población colombiana.

5.3 Equilibrio Hardy-Weinberg

En la tabla 9 se pueden observar los loci Eg 023, Eg 030, Eg 126 y Eg 134, los cuales no se encuentran bajo Equilibrio Hardy-Weinberg con valores de significancia ($P<0,001$), tampoco están en equilibrio los loci Eg 089, Eg 096 y Eg 099 con valores se significancia $P<0,05$.

Tabla 9: Resultados de la prueba de Chi-Cuadrado para el equilibrio Hardy-Weinberg con 13 loci para 25 genotipos del HSC El Salitre.

Locus	Grados de libertad	Chi cuadrado	Prov.	Significancia
Eg 008	3	6.444	0,09187816	ns
Eg 023	10	36.384	0,00007229	**
Eg 024	1	0.342	0,55864354	ns
Eg 030	15	66.111	0,00000002	**
Eg 061	21	18.852	0,59465726	ns
Eg 089	10	22.002	0,01509639	*
Eg 094	10	3.090	0,97921802	ns
Eg 096	6	15.200	0,01875439	*
Eg 099	10	20.425	0,02548336	*
Eg 115	10	7.830	0,64545162	ns
Eg 126	6	30.165	0,00003656	**
Eg 131	21	28.457	0,12765570	ns
Eg 134	15	50.286	0,00001081	**

ns=no significativo, * P<0,05 ** P<0,001.

5.4 Distancia genética entre poblaciones

En el análisis de distancia genética entre las poblaciones australiana y colombiana fueron hallados los siguientes valores:

Identidad genética de Nei: 0,864, Distancia genética de Nei: 0,147. Estos valores indican que la semejanza genética entre las dos poblaciones es bastante amplia, esto significa que la diferencia genética entre poblaciones es reducida.

5.5 Análisis molecular de varianza (AMOVA)

En la tabla 10 se presenta el análisis molecular de varianza para la población estudiada. El AMOVA permite ver que existe una diferencia entre las poblaciones representada por el 4%, diferencia entre individuos 31%, el resto de la varianza en el HSC, se debe principalmente a la variación genética dentro de individuos con 65%.

Tabla 10: Análisis molecular de varianza de frecuencias alélicas para las poblaciones australiana y colombiana.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	Varianza estándar	Porcentaje
Entre poblaciones	1	9,222	9,222	0,154	4%
Entre individuos	23	124,578	5,416	1,328	31%
Dentro de individuos	25	69,000	2,760	2,760	65%
Total	49	202,800		4,243	100%

Tabla 11: Estadísticos F a partir del análisis molecular de varianza.

Estadísticos F	Valor
F_{ST}	0,036
F_{IS}	0,325
F_{IT}	0,349

En la figura tres se puede apreciar la distribución proporcional de la variación genética de los genotipos del huerto se destaca la escasa diferenciación de las poblaciones así como la marcada diferenciación dentro de los individuos.

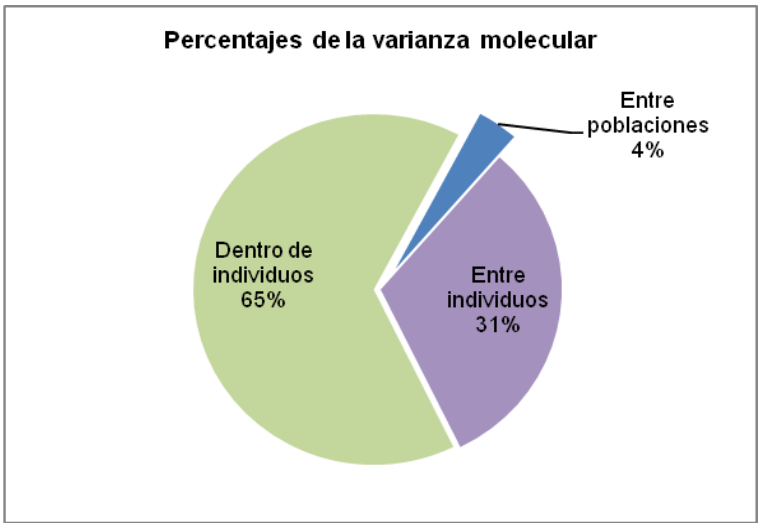


Figura 3: Porcentajes de la varianza molecular AMOVA de las poblaciones australiana y colombiana.

El coeficiente de endogamia dentro de individuos con relación a cada población (F_{IS}) el cual mide la reducción de la heterocigosidad de un individuo debido al apareamiento no aleatorio mostró un valor de 0,325. Mientras que el coeficiente de endogamia dentro de individuos con relación al total (F_{IT}) mostró un valor de 0,349. El coeficiente de endogamia dentro de poblaciones con relación al total (F_{ST}) fue 0,036. Valor que indica una diferenciación genética no significativa entre las dos poblaciones.

5.6 Relaciones de similaridad genética entre genotipos

En la figura 4 se presentan los agrupamientos resultantes a partir de la matriz de distancias genéticas obtenida con el índice de similitud de Jaccard. Cada número corresponde al código del genotipo. En color azul se encuentran los genotipos de procedencia australiana, mientras los genotipos de Colombia se muestran en color rojo. Entre los genotipos 11 de Chanel y 38 de Leprena procedentes de Australia se presentó un valor de similitud genética de 0,13. Este fue el menor valor de similitud genética, lo que indica que entre ellos existe el menor grado de parentesco genético de todos los genotipos que componen el huerto.

Entre los genotipos 39 procedente de Leprena Tasmania y 131 de La Vega Cundinamarca se encontró un valor de similitud genética de 0,54, este fue el valor más alto y corresponde a la pareja de genotipos más similares genéticamente.

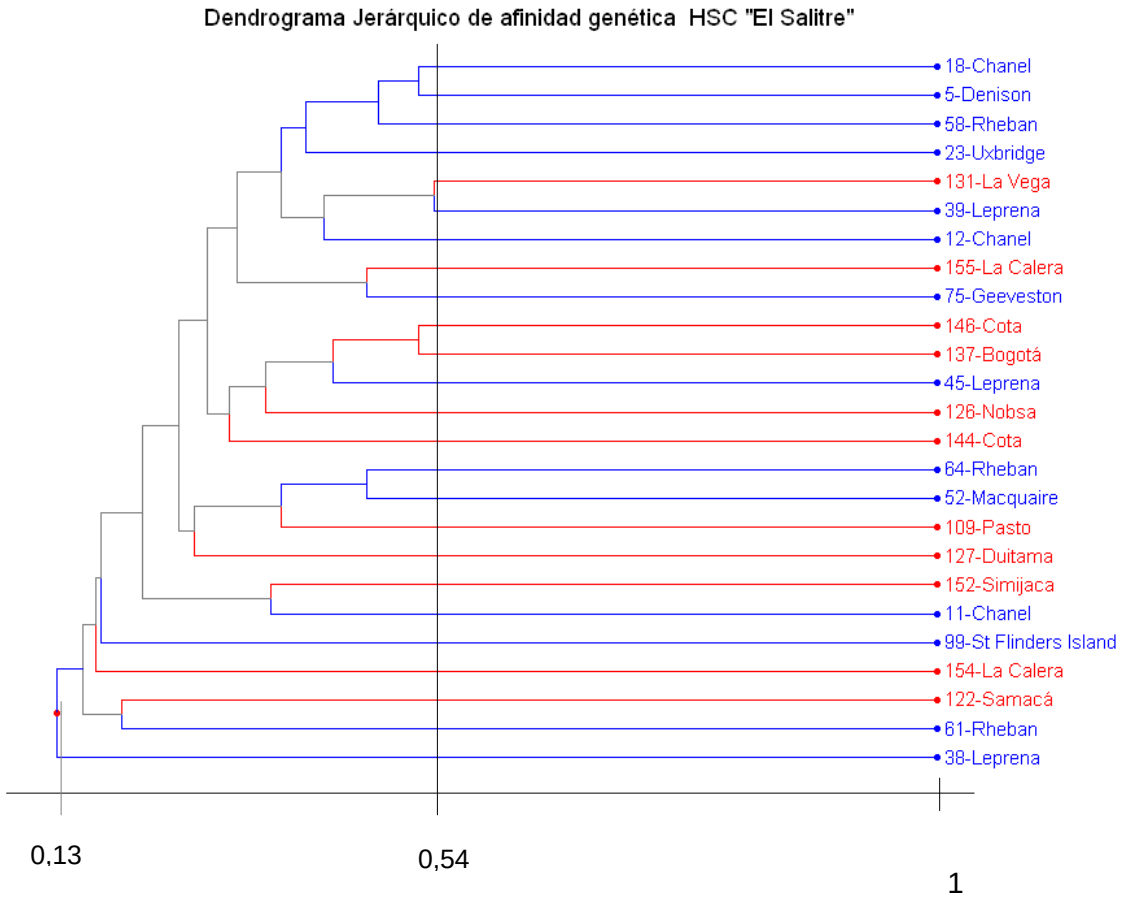


Figura 4: Dendrograma Jerárquico de afinidad genética para 25 genotipos de *E. globulus*, del Huerto Semillero Clonal El Salitre, coeficiente de Jaccard, agrupamiento por UPGMA.

6. Discusión

6.1 Indice de heterocigosidad

Con el propósito interpretar los resultados de los valores de la heterocigosidad esperada, se realizó un análisis mediante la deducción de un índice, que en el presente trabajo fue denominado índice de heterocigosidad, que se expresa de la siguiente manera: La heterocigosidad máxima esperada (He máx.), es el valor más alto de heterocigosidad esperada, que es posible encontrar en función del número de alelos hallados en una población, para determinado locus. Cuya fórmula, es:

$\text{He máx.} = \frac{1}{\text{Na}} \text{ x (Na -1)}$, donde Na es el número de alelos.

Este valor (He máx.) se comparó con la heterocigosidad esperada, la cual a su vez, depende de la frecuencia de alelos en el locus. Esta comparación se hizo por medio este índice de heterocigosidad el cual resulta de la siguiente fórmula:

$$\text{Índice de heterocigosidad} = \frac{He\ Máx. - He}{He\ Máx.}$$

Si los valores de las frecuencias de los distintos alelos en un locus son muy similares es decir, presentan menor variabilidad, entonces se alcanzarán valores de (He) más altos. La (He máx.) se presenta, cuando las frecuencias para todos los alelos de un locus son exactamente iguales. Índices de Heterocigosidad altos muestran, diferencias altas entre la He y la (He máx.), esto a su vez refleja que la variabilidad de la frecuencia de alelos es alta en determinado locus.

Este Índice de heterocigosidad se puede calcular para todos los loci, por medio de la heterocigosidad máxima promedio $\text{He máx. promedio} = \frac{1}{\mu} \text{ x } (\mu \text{ -1})$ donde μ, es el número promedio de alelos, entonces:

$$\text{Índice de heterocigosidad promedio} = \frac{He\ Máx\ prom. - He\ prom.}{He\ Máx\ prom}$$

Este índice de heterocigosidad fue calculado con los resultados diferentes estudios de diversidad genética con microsatélites en *E. globulus.* A partir de los valores del promedio de número de alelos por locus (μ), y de heterocigosidad esperada promedio de estos estudios, se encontraron los siguientes índices de heterocigosidad: 0,069 para RAO Hong-xin *et al.* (2008), 0,087 para Jones *et al.* (2002), 0,118 para Jones *et al.* (2006), 0,096 para Ribeiro *et al*. (2011). El índice de heterocigosidad promedio en el HSC El Salitre fue 0,238, valor superior a los de los otros estudios, indicando que la variabilidad de los valores de frecuencias alélicas en los loci analizados del HSC es muy alta, lo que significa que en la mayor parte de los loci, los alelos encontrados no se distribuyen equitativamente en los individuos del huerto.

6.2 Heterocigosidad esperada

Los valores de heterocigosidad esperada en las poblaciones del HSC fueron de He: 0,583 en la población australiana, y de He: 0,576 en la población colombiana, así como el valor de He: 0,608 al analizar estas dos poblaciones como una sola, son valores comparativamente bajos frente a otros estudios de poblaciones de *E. globulus* con microsatélites. RAO Hong-xin *et al.* (2008) emplearon cuatro SSRs para analizar la diversidad en la progenie de un huerto semillero compuesto por 188 individuos y encontraron He: 0,866. Jones *et al.* (2002) usaron ocho SSRs en 154 individuos de poblaciones naturales y encontraron He: 0,877. Jones *et al.* (2006) evaluaron la diversidad genética de

una población de mejoramiento de 140 individuos y de una población nativa, en su estudio emplearon siete SSRs y la He fue 0,82 y 0,80 respectivamente. Ribeiro *et al*. (2011) en Portugal usaron 16 SSRs en un grupo de 125 individuos de una población de mejoramiento encontrando valores de He: 0,85.Le heterocigosidad esperada baja en el HSC se presenta como el resultado de la baja riqueza alélica, y como consecuencia de una marcada diferenciación de las frecuencias alélicas en varios locus, de acuerdo a lo explicado anteriormente sobre el índice de heterocigosidad.

6.3 Riqueza alélica

Los valores de riqueza alélica promedio en las dos poblaciones fueron bajos (4,23 y 3,85). Los valores de la He se ven afectados en forma directa por la riqueza alélica, que es el número de alelos hallados por locus; entre mayor sea la riqueza alélica mayor es la posibilidad de encontrar valores altos de He.

En el HSC El Salitre, los valores bajos de He pueden deberse al reducido número de individuos que componen el huerto. Lo anterior posiblemente condicionó la riqueza alélica de los loci analizados. Steane *et al.* (2001) usaron 12 SSRs en árboles nativos de *E. globulus***,** en su análisis plantearon que, la riqueza alélica encontrada en su estudio Na: 17,8, es alta si se compara con otros estudios en *E. urophylla* y *E. grandis*, Brondani *et al*. (1998), y en *E*. *nitens* Byrne *et al* (1996); así mismo en la investigación de Steane *et al.* (2001) se afirma que estas diferencias responden al hecho de haber trabajado con una muestra de 88 individuos, que es superior a la otras investigaciones mencionadas, donde se evaluaron 16 individuos en cada una de ellas.

Mientras que los valores de He entre la población australiana y colombiana son similares, la riqueza alélica es mayor en la población australiana. Tanto el origen como la estrategia de selección de los árboles que dieron origen a las familias que componen la población base de mejoramiento del HSC, explicarían las diferencias en la riqueza alélica. Mientras que los árboles seleccionados en

Australia provienen del bosque nativo en el área de distribución natural de la especie, los árboles seleccionados en Colombia provienen de plantaciones comerciales. Lo anterior puede sugerir la perdida de alelos en la población colombiana como efecto de la selección de individuos en poblaciones menos diversas, como son las plantaciones.

6.4 Heterocigosidad observada (Ho)

El valor de heterocigosidad observado Ho: 0,45 es inferior a los reportados en la literatura para poblaciones de mejoramiento, 0,789 RAO Hong-xin *et al.* (2008), 0,73 Ribeiro *et al.* (2011). El valor promedio de Ho: 0,445 de la población australiana fue un poco menor que el valor Ho: 0,465 de la población colombiana, diferencias similares han sido encontradas en la Ho al comparar la diversidad de poblaciones de origen nativo frente a poblaciones de mejoramiento. Jones *et al.* (2006) encontró en una población compuesta por individuos de diez razas nativas de *E. globulus* que la Ho fue 0,66, mientras que en la población de mejora la Ho fue 0,71.

6.5 Número efectivo de alelos (Ne)

Los resultados en el número efectivo de alelos, indican que además de ser baja la cantidad de alelos, las frecuencias alélicas se distribuyen en la mayor parte de los loci de forma heterogénea, es decir, que para cada alelo dentro de un locus, los individuos tienen una participación no proporcional.

Los valores promedios del índice de fijación F de ambas poblaciones (0,189 y 0,197) son similares a los encontrados porRibeiro *et al.* (2011) (F: 0,141), por Jones *et al.* (2006) (F:0,134). RAO Hong-sin *et al.,* (2008)usando cuatro microsatélites en 188 individuos progenie de una población de mejoramiento de *E. globulus* encontraron un valor bajo de (F: 0,089).Valores de F cercanos a cero son esperados bajo el supuesto de apareamiento aleatorio, sin embargo llama la atención, que en la investigación de RAO Hong-sin *et al.,* (2008) se encuentren altas tasas de autopolinización en la progenie analizada, y que el valor de F en

este reporte sea menor que en los demás estudios incluyendo el del HSC El Salitre.

6.6 Diferenciación genética ente poblaciones

El resultado del coeficiente de endogamia promedio F_{ST}: 0,045, mide la cantidad de variación entre las poblaciones australiana y colombiana relativa al total de la variación. Esta cifra lo que muestra, es que la diferenciación entre estas poblaciones es poco significativa. Resultados similares fueron reportados por Jones *et al.* (2006), quienes monitorearon la diversidad genética del Programa de Mejoramiento Genético Nacional Australiano de *E. globulus.* La población base del programa de mejoramiento se desarrolló a partir de semilla colectada a 80 árboles nativos en 24 localidades. De esta población base se seleccionaron 140 genotipos para conformar una población de mejoramiento de primera generación, algunos individuos podrían ser hermanos medios o completos. De acuerdo con la clasificación realizada por Steane *et al.* (2006) los 140 genotipos, al igual que una muestra de 340 árboles nativos fueron clasificados en siete y diez razas respectivamente. Al comparar grupos de árboles de la población de mejoramiento con árboles nativos de su respectiva raza, no se encontró diferenciación genética significativa, sino en dos de las siete razas. Basado en esto Jones *et al.* (2006) afirmaron que durante el proceso de mejoramiento ocurrió muy poca divergencia genética entre la población de mejoramiento y sus correspondientes razas nativas. Así mismo, la escasa diferenciación demostrada por el valor reducido de F_{ST}: 0,045 entre las dos poblaciones del HSC El salitre, puede convertirse en indicio de una reducida divergencia genética entre las razas locales de *E. globulus* y las poblaciones naturales de Australia.

El resultado de la identidad genética de Nei: 0,864, y de la distancia genética de Nei: 0,147, así como el análisis molecular de varianza AMOVA donde F_{ST} fue 0,036, permiten dar solidez a la afirmación acerca de la escasa divergencia entre

las dos poblaciones del HSC El Salitre. El proceso de adaptación de *E. globulus* a las condiciones ambientales en la región colombiana durante casi 150 años que da origen a razas locales, así como la selección, posiblemente no han influido notoriamente en la diferenciación alélica de los genotipos de la población colombiana frente a la de los genotipos australianos, como para propiciar una divergencia genética significativa entre estas dos poblaciones.

6.7 Amplificación de secuencias

Los marcadores microsatélites Eg 128 y Embra 5 amplificaron en muy pocos genotipos por lo cual fueron descartados dentro del análisis de diversidad. Estos mismos marcadores son reportados por Thamarus *et al.* (2004) por estar ligados al QTL de densidad de madera. La selección de genotipos del HSC El Salitre fue realizada por el crecimiento en volumen de madera, escogiendo dentro de las mejores familias los individuos de mayor volumen de madera. Se conoce que la densidad alta de la madera en los árboles, es un rasgo que por lo común no está asociado a buen crecimiento, teniendo en una plantación individuos de buen crecimiento con baja densidad y viceversa. En este sentido es probable que los marcadores mencionados no hubiesen amplificado en varios de los individuos del HSC ya que estos fueron seleccionados por ser mejores en crecimiento en volumen característica que por lo general no está asociada a genotipos de altas densidades de madera.

Ribeiro *et al.* (2011) para el estudio de una población de mejoramiento, emplearon dieciséis SSRs dentro de los cuales incluyeron a Embra 5. Para este marcador encontraron que su valor de Na: 21, fue de los más altos, el valor de Ne: 5,2 fue de los más bajos, la He fue 0,82, en este marcador también se obtuvo la más baja Ho: 0,50, lo que dio lugar a un Fis: 0,34 de los más altos entre los marcadores usados. Así mismo se encontró que Embra 5 presentaba desviación significativa equilibrio H-W, atribuidas a la posible existencia de alelos nulos.

6.8 Recomendaciones para el manejo del germoplasma del huerto semillero clonal (HSC) El Salitre

6.8.1 Respecto a la consanguinidad

Venegas (1989) planteó, que como consecuencia de la forma tradicional de colectar semilla de *E. globulus*, y dado el considerable número de generaciones que han transcurrido desde la introducción de la especie al país, las razas locales presentan altos grados de consanguinidad. Arias y Castillo (1995), basándose en resultados encontrados a través de la evaluación fenotípica de diferentes caracteres morfológicos, concluyeron lo mismo respecto a los altos grados de consanguinidad de las razas locales.

A diferencia de lo mencionado anteriormente, en la evaluación de los genotipos realizada en este estudio, al huerto semillero clonal (HSC) El Salitre, empleando marcadores moleculares tipo microsatélites, no se encontraron relaciones de similitud genética superiores a 0,54. Esto significa que genéticamente los genotipos del HSC son muy diferentes; inclusive entre los genotipos colombianos de los que se esperaría mayor grado de parentesco genético, el grado de similitud es muy bajo. Esto indica que la depresión por endogamia derivada del cruzamiento entre genotipos consanguíneos no debe considerarse en adelante como un riesgo latente en esta población de mejoramiento, incertidumbre que no hubiera sido resuelta de no haber realizado el presente estudio.

6.8.2 Respecto al número de individuos del HSC

La diversidad genética del HSC El Salitre, descrita por bajos los valores hallados, tanto en la heterocigosidad esperada como en el número promedio de alelos, es atribuida a la reducida cantidad de genotipos presentes en el HSC. Esta situación exige la programación de actividades para aumentar el número de genotipos superiores en el Huerto.

6.8.3 Respecto a la polinización

El análisis molecular demostró que siete de los 13 loci SSRs no están bajo equilibrio H-W. Este desequilibrio puede extenderse y ocasionar pérdida de alelos de interés en la progenie de los genotipos del HSC, si se tienen en cuenta que en el HSC no todos los genotipos han alcanzado su primera etapa de floración. Esta situación favorece la autopolinización, o el cruce de muy pocos individuos. Hardner *et al.,* (1995), reportaron disminuciones severas en la producción por el uso plántulas que se obtienen de semillas resultado de la autopolinización. Una de las estrategias para permitir la sincronía y homogenización en la obtención de flores es la aplicación de paclobutrazol. Adicionalmente, se considera necesaria la implementación de sistemas de polinización controlada tanto para asegurar el cruzamiento de todos los genotipos como para el aprovechamiento de los efectos combinatorios específicos.

A. Anexo: Genotipos y cantidad de ramets del huerto semillero clonal El Salitre.

Código ortet	Cantidad de ramets	LUGAR DE PROCEDENCIA		
		País	Localidad	Estado ó Departamento
5.III.	3	Australia	Denison	Tasmania
11.I.	3	Australia	Chanel	Tasmania
12.I.	1	Australia	Chanel	Tasmania
18.I.	1	Australia	Chanel	Tasmania
23.I.	2	Australia	Uxbridge	Tasmania
38.IV.	1	Australia	Leprena	Tasmania
39.VII.	3	Australia	Leprena	Tasmania
45.IX.	1	Australia	Leprena	Tasmania
52.I.	2	Australia	Macquaire	Tasmania
58.III.	1	Australia	Rheban	Tasmania
61.IX.	3	Australia	Rheban	Tasmania
64.VII.	1	Australia	Rheban	Tasmania
75.II.	5	Australia	Geeveston	Tasmania
99.I.	1	Australia	St. Flinders Island	Tasmania
109.V.	1	Colombia	Pasto	Nariño
122.III.	1	Colombia	Samacá	Boyacá
126.VI.	5	Colombia	Nobsa	Boyacá
127.V.	3	Colombia	Duitama	Boyacá
131.II.	3	Colombia	La Vega	Cundinamarca
137.III.	3	Colombia	Bogotá	Cundinamarca
144.II.	1	Colombia	Cota	Cundinamarca
146.VI.	3	Colombia	Cota	Cundinamarca
152.II.	4	Colombia	Simijaca	Cundinamarca
154.IV.	3	Colombia	La Calera	Cundinamarca
155.I.	1	Colombia	La Calera	Cundinamarca

B. Anexo: Código de identificación de los ramets del huerto semillero clonal El Salitre

Listado de ramets* del HSC El Salitre		
5.III.154	61.IX.61	131.II.131
5.III.5	61.IX.61	131.II.131
5.III.5	64.VII.64	131.II.45
11.I.11	75.II.75	137.III.103
11.I.11	75.III.75	137.III.137
11.I.11	75.III.75	137.III.137
12.I.155	75.III.75	144.II.144
18.I.18	75.III.75	146 VI 146
23.I.137	99.I.99	146.VI.146
23.I.23	109.V.155	146.VI.146
38.IV.38	122.III.105	152.II.152
39.VII.39	126.VI.103	152.II.152
39.VII.39	126.VI.126	152.II.152
39.VII.39	126.VI.126	152.II.5
45.IX.45	126.VI.126	154.IV.131
52.I.12	126.VI.156	154.IV.154
52.I.52	127.V.127	154.IV.154
58.III.58	127.V.127	155.I.155
61.IX.38	127.V.127	

* El primer número corresponde al código del genotipo llamado ortet, los de igual código inicial son clones del mismo genotipo o ramets.

C. Anexo: Reactivos y concentraciones del protocolo de extracción de ADN adaptado de (Ribeiro y Lobato, 2007)

Análisis comparativo de diferentes protocolos de extracción ADN en tejido vegetal fresco y de herbario en especímenes del género Dalbergia Protocolo A (modificado de - Doyle and Doyle, 1990)						
BUFFER extracción	**Volumen a preparar total**		**100 ml**			
REACTIVO	**STOCK**		**Concentración Final**		**Volumen**	
CTAB			2	%	0,4	g
Tris/HCl, pH 7,5	1000	mM	100	mM	2	ml
NaCl	5000	mM	1400	mM	5,6	ml
PVP -40			2	%	0,4	g
EDTA pH 8,0	500	mM	20	mM	0,8	ml
B mercaptoetanol	20 µl por cada ml de buffer de extracción a usar					
BUFFER TE/RNAsa	**Volumen a preparar total**				**10 ml**	
REACTIVO	**STOCK**		**Concentración Final**		**Volumen**	
Tris HCl pH 8,0	1000	mM	10	mM	100	µl
EDTA pH 8,0	500	mM	1	mM	20	µl
RNAsa	20.000	µg/ml	10	µg/ml	5	µl
	20	mg/ml	1	mg/ml	500	µl
Otros reactivos			**Concentración**		**Volumen**	
Cloroformo : Alcohol isoamílico alcohol (CIA)			**24:1**		50	ml
Etanol			**70%**		**50**	**ml**
Isopropanol						

Bibliografía

Acuña, C., S. Torrales, M. Martin, L. Harrand y S. Marcucci. 2002. Utilización de marcadores moleculares en el análisis de la variabilidad genética de una población de mejoramiento de *Eucalyptus grandis.* Concordia, Argentina: Conferencia "17º Jornadas Forestales de Entre Ríos", 24-25 Oct.

Álvarez, C. y Orjuela, L. 1985. Ensayos de mejoramiento genético en *Eucalyptus globulus*. Trabajo de grado Ingeniería Forestal, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 125 p.

Ángulo, C. 2010. Establecimiento, fenología y biología reproductiva del huerto semillero clonal del *Eucalyptus globulus* (Labill.) en la finca "El Salitre" Choachí (Cundinamarca). Trabajo de grado en Ingeniería Forestal, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 88 p.

Arias, A.J., A. Castillo. 1995. Variación del Peso Específico de la Madera y otros Caracteres entre Procedencias de *Eucalyptus globulus* en un Huerto Semillero. En: Trabajo de grado en Ingeniería Forestal, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 201 p.

Bassam, B.J., G. Caetano-Anollés y P.M. Gresshoff 1991. A fast and sensitive silver staining for DNA in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 196:80-83.

Butcher, P., J. C. Glaubitz y G. F. Moran.1999. Aplicaciones de los marcadores microsatélites en la domesticación y conservación de árboles forestales. pp. 38-47 En: Recursos Genéticos Forestales No. 27, http://www.fao.org/docrep/008/x4133s/X4133S07.htm, consultado en febrero de 2013.

Butcher, P. y S. Southerton. 2007. Marker-assisted selection in forestry species. pp. 284-296. In: Marker-assisted selection – Current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish. FAO, Roma. 471 p.

Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Primera edición. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia. 220 p.

Fory S. 2005. Caracterización y análisis molecular de la diversidad genética de la colección colombiana de lulo (*Solanum quitoense* LAM) y seis especies

relacionadas de la sección Lasiocarpa En: Tesis Magister en Ciencias Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira, Colombia. 89 p.

Igartúa, D. V., S. E. Monteoliva, M. G. Monterubbianes y M. S. Villegas. 2002. Calidad del leño en *Eucalyptus globulus* ssp*. globulus*: II. Variaciones en la densidad básica y la longitud de fibras en Lobería. Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata 105-1. 11 p.

Ipinza, R. 1998. Mejoramiento Genético Forestal. Serie técnica No. 42. CONIF, Santafé de Bogotá. 162 p.

Jones, R., D. A., Steane, B. M. Potts, y R. E. Vaillancourt. 2002. Microsatellite and morphological analysis of *Eucalyptus globulus* populations. Can. J. For. Res. 32: 59–66

Jones, R., Steane, D., Pilbeam, D., Potts, B., Vaillancourt, R. 2006. Forest Ecology and Management, Effects of domestication on genetic diversity in *Eucalyptus globulus*. 234 p. 78–84.

Llanos. C. y L. Flórez. 2000. Evaluación, Diseño del aclareo, Ensayo de progenies y Propagación vegetativa de *Eucalyptus globulus* Labill en el Huerto Semillero de La Florida. En: Tesis de grado Ingeniería Forestal, Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 133 p.

Marcucci, S., C. Acuña, S. Torrales, N. Zelener, P. Pathaver y G. López. 2005. Evaluación de la Variabilidad Genética en huertos semilleros de especies de *Eucalyptus*. Revista de Información sobre Investigación y Desarrollo Agropecuario Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. 21(8), 180-184. http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/forest/genetica.htm p.; consulta: marzo de 2009.

Marcucci, S. 2005. Capitulo 3: Marcadores Moleculares aplicados a Programas de Mejoramiento Genético de Eucaliptos. pp. 223-234 En: Mejores árboles para más forestadores: el programa de producción de material de propagación mejorado y el mejoramiento genético en el proyecto forestal de desarrollo. SAGPyA, Buenos Aires (Argentina), http://orton.catie.ac.cr/cgi-bin/wxis.exe/?IsisScript=E-LIM.xis&method=post&formato=2&cantidad=1&expresion=mfn=013737 p.; consulta: marzo de 2009

Picca, A., M. Helgura, N. Salomón y A. Carrera. ***2004*****.** Capitulo 4: ***Marcadores moleculares***. pp. 61-68 En: Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ediciones INTA, Argentina. http://www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/parte2_cap4.pdf p.; consulta: marzo 2009.

Pinto, P., D.V. Evtuguin y C. P. Neto. 2003. The Chemistry of *Eucalyptus globulus* wood: pecularities and impact on pulping and bleaching behavior. University of Aveiro, Portugal. 196 p.

Potts, B.M., Vaillancourt, R.E., Jordan, G., Dutkowski, G.W., Costa e Silva, J., McKinnon, G., Steane, D., Volker, P., Lopez, G.A., Apiolaza, L.A., Li, Y., Marques, C., Borralho, N.M.G. 2004. Exploration of the Eucalyptus globulus gene pool. Aveiro, Portugal: IUFRO Conference "Eucalyptus in a changing world", 11-15 Oct.

Promega. 2008. Technical Manual. Silver Sequence ^{TM}DNA Sequencing System. Promega Coorporation. Madinson. p. 1-19.

RAO Hong-xin, Briony Patterson, Brad Potts, Rene Vaillancourt. 2008. A microsatellite study on outcrossing rates and contamination in an Eucalyptus globulus breeding arboretum. Journal of Forestry Research 19(2):136–140

Ribeiro, R., Lovato. M. 2007. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*. Genetic and molecular research. 6 (1): 173-187

Rocha, M. 2007. Comercialización de productos maderables provenientes de plantaciones comerciales de Pino y Eucalipto en el Altiplano Cundiboyacense. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 117 p.

Salas, M y Salazar, 2007. Evaluación Fenotípica del Huerto Semillero de Eucalyptus *globulus* La Florida y Determinación del Protocolo de Enjertación orientado a la Propagación de individuos Sobresalientes. Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá. 103 p.

Smith, J. 2001. Arboles, la Inversión Familiar Ideal. En: Forestalnet.com. Argentina

Skolmen, R. y T. Ledig. 1990. *Eucalyptus globulus* Labill, Blue gum eucalyptus. En: U.S. Department of Agriculture, Forest Service, http://www.fs.fed.us/global/iitf/Eucalyptusglobulus.pdf, consultado en marzo de 2009

Steane DA, Vaillancourt RE, Russel J, Powell W, Marshall D, Potts BM. 2001.Development of microsatellite loci in Eucalyptus globulus (Myrtaceae). Silvae Genet 50:89–91

Steane, D., Conod, N., Jones, R., Vaillancourt, R., Potts, B., 2006. A comparative analysis of population structure of a forest tree, Eucalyptus globulus (Myrtaceae), using microsatellite markers and quantitative traits.Tree Genet. Genomes 2, 30–38.

Thamarus, K., K. Groom, J. Murrell, y M. Byrne. 2002. A genetic linkage map for *Eucalyptus globulus* with candidate loci for wood, fibre, and floral traits. Theor Appl Genet. 104 (3), 379-387.

Thamarus, K., K. Groom, A. Bradley, C.A. Raymond, L. R. , E.R. Williams, G.F. Moran Byrne. 2004. Identification of quantitative trait loci for wood and properties in two full-sib pedigrees of *Eucalyptus globulus*. Theor Appl Genet. 109, 856-864.

Venegas, L. 1989. Instalación y manejo de un huerto semillero de *Eucalyptus globulus* en Colombia, INDERENA, Bogotá. 13 p.