

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL**

Desarrollo de recursos genómicos en *Tectona grandis*.

**Fase II, Secuenciación del genoma y búsqueda de marcadores SNPs para su
utilización en mejoramiento genético.**

2019-2021

Ing. Olman Murillo Gamboa (coordinador), Ph.D.
Ing. Jose Pablo Jiménez Madrigal, Ph.D.

Diciembre 2023

2. Tabla de Contenido

3. Código y Titulo	3
4. Autores y dirección:	3
5. Resumen	3
6. Palabras clave	3
7. Introducción	4
8. Metodología	6
9. Resultados	9
10. Discusión.....	23
11. Conclusiones generales	24
12. Recomendaciones generales	25
13. Agradecimientos	25
14. Referencias.....	26
15. Anexos	31

3. Código y Título

- **Centro Funcional:** 1401-083
- **Título:** Desarrollo de recursos genómicos en *Tectona grandis*. Fase II, Secuenciación del genoma y búsqueda de marcadores SNPs para su utilización en mejoramiento genético.

4. Autores y dirección:

- Ing. Olman Murillo Gamboa, PhD. Coordinador. Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Central Cartago. omurillo@itcr.ac.cr
- Biol. Jose Pablo Jiménez Madrigal, PhD. Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Campus Tecnológico Local San Carlos. jpjimenez@itcr.ac.cr

5. Resumen

Tectona grandis es una de las principales especies maderables del mundo; debido a su belleza, resistencia y durabilidad. Ha sido sujeta de mejoramiento genético con el propósito de incrementar su productividad y calidad en plantación. El uso de marcadores genéticos convencionales no permite su relación directa con rasgos de importancia económica. Las nuevas técnicas de secuenciación molecular permiten utilizar información directa del código genético en la identificación de individuos superiores y análisis poblacional. Esto permitiría acortar los ciclos de selección y desarrollo de nuevas generaciones de mejoramiento, actualmente 8-10 años. El proyecto tuvo como propósito desarrollar recursos genómicos en teca para su aplicación en el mejoramiento genético. Como primer paso se secuenció y ensambló el genoma completo de teca. Asimismo, se utilizó una técnica de reducción de la complejidad para secuenciar una colección de 35 árboles plus, de GENFORES (Cooperativa de mejoramiento genético forestal, Escuela de Ingeniería Forestal). De esta secuenciación de baja representación se identificaron variantes puntuales (SNPs), en particular 10 816 loci polimórficos. Luego, se realizó un análisis de asociación genómica (GWAS), resultando en 43 SNPs relacionados de manera positiva con rasgos de interés, como: diámetro, volumen comercial, peso específico de la madera, proporción de duramen, calidad del árbol y color del duramen. Más aún, los valores de predicción genómica oscilaron entre un 50 y 60% de probabilidad de certeza. Estos primeros resultados auguran una alta probabilidad de selección genómica temprana de genotipos élite de teca.

6. Palabras clave: Selección genómica, GWAS, SNPs, marcadores genéticos, teca.

7. Introducción

Teca (*Tectona grandis* L.f.) es una de las principales especies maderables del mundo con presencia en casi todas las regiones tropicales y subtropicales (Keogh 2013). Un buen material de plantación, un sitio apropiado y prácticas silvícolas adecuadas son esenciales para el éxito de la inversión en el cultivo de tecla (Murillo et al. 2013, Alvarado & Mata 2013).

La tecla ha sido objeto de esfuerzos de mejora genética durante mucho tiempo con gran éxito en varios países (Kaosa-ard et al. 1998, Callister & Collins 2008, Monteuis et al. 2011, Goh et al. 2013, Murillo et al. 2019) y un gran potencial en la mejora de los rasgos de la madera (Varghese et al. 2000, Narayanan, Chawhaan y Mandal 2009, Moya & Alvarado 2012, Moya et al. 2013, Putro et al. 2020). Las estrategias de mejora del árbol han ido evolucionando hacia la silvicultura clonal en las dos últimas décadas. Lo anterior, debido a sus mayores ventajas en el proceso de mejora (Palanisamy et al. 2009, Moya et al. 2013, Badilla, et al. 2016, Hine et al. 2019, Murillo et al. 2019).

El uso de marcadores genéticos en tecla también ha sido un área prolífica de atención para los científicos durante las últimas décadas (Kertadikara & Prat 1995, Verhaegen et al. 2005, Narayanan et al. 2007, Alcântara & Veasey 2013, Minn et al. 2014, Minn et al. 2016, Huang et al. 2016, Vaishnaw et al. 2018). Se ha reportado el uso de todos los tipos de marcadores genéticos, pero su uso se ha limitado a evaluar la diversidad genética, los posibles centros de origen de las poblaciones de tecla introducida en los países, y la identidad o genotipo de árboles elite (Fofana et al. 2008, Fofana et al. 2009, Verhaegen et al. 2010, Ansari et al. 2012, Lyngdoh et al. 2013, Huang et al. 2015, Huang et al. 2016, Win, Hirao & Goto 2016, Hansen et al. 2017, Prasetyo et al. 2020, Balakrishnan et al. 2021, Wanders et al. 2021, Swathi et al. 2023). Más aún, la neutralidad de los marcadores genéticos tradicionales ha sido un impedimento para poder relacionarlos con rasgos económicamente importantes. Sin embargo, existen algunos ejemplos que examinan el uso potencial de marcadores moleculares para la mejora directa de árboles de tecla (Watanabe & Widyatmoko 2004, Araya et al. 2005, Narayanan et al. 2007).

En la actualidad, grupos de investigación de todo el mundo están adoptando

rápidamente las nuevas tecnologías de secuenciación de ADN para conseguir una lectura mucho más amplia y representativa del genoma, buscar su asociación con caracteres de interés, desarrollar nuevos marcadores genéticos de mayor precisión, y avanzar hacia la selección genómica. (Neale & Kremer 2011, Thwe-Thwe-Win, Hirao, & Goto 2016, Yasodha et al. 2018, Thakor et al. 2019, Zhao et al. 2019, Dunker et al. 2020, Wang, Song, Xing 2020, de Oliverira et al. 2021). El genoma de la teca fue secuenciado hace unos años (Zhao et al. 2019), también se han realizado diferentes análisis del transcriptoma y del proteoma (Quiala et al. 2012, Diningrat et al. 2015, Galeano et al. 2014, Galeano et al. 2015, Tripathi, Yadav & Saikia 2017, Hurtado et al. 2020). Sin embargo, todos estos estudios son de naturaleza descriptiva, proporcionan información valiosa, pero los datos no están fácilmente disponibles ni se pueden aplicar fácilmente a programas de mejora genética.

La mejora asistida por marcadores genéticos requiere de información precisa, como la generada por técnicas de genotipado por secuenciación. Estas técnicas permiten el desarrollo de modelos de selección genómica, los cuales, a su vez posibilitan la selección temprana de materiales no evaluados. Por lo tanto, se esperan mayores ganancias genéticas y ciclos de mejora más rápidos con aplicaciones genómicas (Hayes et al. 2009, Grattapaglia & Kirst 2008, Grattapaglia & Resende 2011, Isik, Holland & Maltecca 2017, Metzker 2010, Neale & kremer 2011, Desta & Ortiz 2014, Jiménez et al. 2017).

GENFORES, líder en mejoramiento genético de teca en América Latina, será el primer programa de mejoramiento de teca en utilizar tecnologías de secuenciación de alto rendimiento, no sólo para avanzar en nuestra comprensión de su genómica funcional, sino para apuntar directamente a rasgos complejos relacionados con productividad y calidad de su madera. Esto permitiría acortar significativamente los ciclos de selección y evaluación de nuevas generaciones de mejoramiento. Hoy día se tarda cerca de 5 años para evaluar las accesiones en campo (Badilla y Murillo, 2023), esto para identificar los mejores genotipos con respecto a su valor genético en productividad. De mayor relevancia resulta poder evaluar temprano propiedades de la madera, que por lo general requieren que los árboles hayan alcanzado mayor edad, como buen ejemplo de esto tenemos el caso del color del duramen al momento de la cosecha.

Por tanto, en el programa de mejoramiento genético de teca de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, se pretendió con esta investigación desarrollar recursos y herramientas genómicas para apoyar el mejoramiento genético de *T. grandis*. En particular, se buscó generar una secuencia del genoma completo de la especie e identificar marcadores moleculares de alta precisión para su uso en selección genómica.

8. Metodología

El proyecto tuvo como objetivo general “Desarrollar recursos genómicos para fortalecer el mejoramiento genético en *Tectona grandis*. Como un primer objetivo específico se propuso, “generar una primera secuenciación del genoma de *T. grandis*”. Como segundo objetivo específico se propuso “identificar marcadores moleculares tipo SNP en *T. grandis* con fines de mejoramiento genético”. Finalmente, como tercer objetivo específico se propuso “Analizar niveles de expresión génica en genotipos superiores de *T. grandis*.”. Que luego se modificó por una mayor aplicabilidad inmediata en “asociación de los nuevos marcadores moleculares con rasgos de importancia económica”. Importante mencionar con esto, que la misma naturaleza del desarrollo del proyecto permitió reorientar y avanzar un paso más hacia la utilización de la información genómica.

Como parte del programa de mejora genética de teca en GENFORES, en 2019 se inició un proyecto genómico en colaboración con la Universidad Estatal de Carolina del Norte, USA (Escuela de Recursos Naturales, Laboratorio de Ciencias Genómicas). Se secuenciaron 33 genotipos élite de teca procedentes de 9 programas de mejora independientes, todos ellos emparejados con sus valores genéticos (software EMBRAPA/SELEGEN Resende 2016) para los caracteres de importancia económica: volumen comercial, el diámetro a la altura del pecho (DAP), peso específico de la madera, porcentaje de duramen, color del duramen y calidad del fuste.

Preparación del ADN genómico y secuenciación:

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de purificación y reactivos del kit comercial DNeasy Plant Mini (Qiagen®). Las muestras de ADN purificado se cuantificaron utilizando un Nanodrop®, se separaron en alícuotas con una concentración final de 50ng/ul y se almacenaron a -20°C. Las bibliotecas genómicas se prepararon siguiendo el protocolo establecido por Peterson y colaboradores (2012), que utiliza simultáneamente dos enzimas diferentes, con sitios de reconocimiento de 4 y 6 pares de bases respectivamente. Esto aseguró una digestión uniforme en todo el genoma.

Un análisis preliminar utilizando ADN genómico de cuatro árboles de *Tectona grandis* con las enzimas de restricción PstI y MspI, dio como resultado aproximadamente 40000 fragmentos secuenciales de 250-350 pares de bases por individuo. A continuación, se prepararon bibliotecas génicas de fragmentos cortos para insertos de 270 pb y 500 pb y lecturas de 125 pb y 150 pb respectivamente, ambas diseñadas para la plataforma de secuenciación Illumina. Este equipo tiene capacidad para producir hasta 200 millones de lecturas por celda de secuenciación, lo que garantiza una cobertura mínima de 100x para un genoma de 470Mb (tamaño estimado de *Tectona grandis*).

La evaluación y análisis de la calidad de las secuencias se realizó a través del software FastQC, BBduk, el ensamblaje asistido se construyó a través de los programas SPAdes, RagTag, QUAST, y los resultados se compararon con el genoma de referencia publicado por Zhao et al. (2019) a través de las herramientas BWA, Samtools, Freebayes y VCFtools, lo que resultó en un 91% del genoma de referencia completo. El análisis *in silico* identificó PstI y MspI como par óptimo de digestión enzimática. La identificación de variantes con mpileup mostró 11615 SNPs que se utilizaron luego para la construcción de matrices de correlación y mapas de segregación. De este conjunto de datos se obtuvieron finalmente 10812 marcadores SNPs polimórficos con MAF>0,05 y una precisión realizada del 93%.

Análisis estadísticos de asociación

Se organizó una base de datos con los 10816 loci (SNPs) determinados para cada uno de los 33 genotipos investigados. Estos datos se habían filtrado previamente

para eliminar los *loci* con un exceso de genotipos ausentes, una frecuencia alélica menor inferior a 0,05 o con genotipos monomórficos. A partir del conjunto de datos inicial los *loci* con más de 10 genotipos ausentes se eliminaron de la base de datos por medio de la herramienta LinkImpute, con una precisión del 93%. Los 10.812 *loci* restantes tenían hasta 7 genotipos faltantes, con una tasa global de valores perdidos del 2,0%.

Se proporcionaron valores del ranking genético de cada clon (obtenidos previamente mediante el software SELEGEN, Resende 2017) para los siguientes rasgos: Calidad del árbol (atributos de forma) a los 5 años, DAP a los 5 años, Volumen comercial a los 5 años, Gravedad específica de la madera, Porcentaje de duramen, Color de duramen A, Color de duramen B y Color de duramen C. Sin embargo, solo 26 clones eran comunes a ambos conjuntos de datos, por lo que esta fue la base final de análisis de asociación entre los SNPs y los valores de los 6 rasgos económicos. Se calculó la matriz de relación genómica (GRM) para el conjunto completo de 33 clones genotipados y el subconjunto de 26 clones con valores de rasgos clonales utilizando el paquete ASRgenomics de R. Se ajustaron modelos de predicción genómica a los clones con valores de rasgos clonales. Los modelos de predicción genómica se ajustaron a los valores de los clones para cada uno de los 8 rasgos por separado, utilizando cinco modelos diferentes ajustados con el paquete BGLR: Bayes A, Bayes B, Bayes C, Bayes Lasso, Bayesian Ridge Regression. Cada modelo se ajustó al conjunto de datos completo de 26 clones utilizando 100 000 iteraciones, una fase inicial de entrenamiento de 20 000 iteraciones y un raleo de 5.

Se recopilaron las estadísticas resultantes para medir la bondad del ajuste, varianza del error, pD y criterio de información de desviación (DIC). La precisión de la predicción se calculó utilizando la validación cruzada de dejar uno elemento por fuera. Para cada uno de los 26 clones el modelo predijo su valor genómico para el rasgo en cuestión. La correlación entre los 26 valores genómicos predichos y los valores observados de los clones se tomó como la precisión de predicción para la combinación rasgo-modelo.

Asociación de los marcadores SNP con rasgos de importancia económica

Los análisis del estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) se completó utilizando el paquete ASRgwas de R. El preprocesamiento identificó 413 marcadores en la muestra de donde se eliminaron 124 porque su MAF era inferior a 0,05. Otros 124 marcadores se eliminaron porque su heterocigosidad era superior a 0,8. Un total de 5 marcadores se eliminaron porque su valor de $|F|$ era superior a 0,98. La matriz final de marcadores depurada contenía 26 individuos y 10270 marcadores SNPs. La inversa de la matriz G (GRM) parecía estar mal condicionada, con un número de condición recíproco de $6,4 \cdot 10^0$. Por lo tanto, se mezcló con una proporción de la matriz de marcadores y la matriz de identidad. A partir de la matriz de parentesco se calculó una matriz Q de 20 vectores propios que describían la estructura de la población y se elaboró un gráfico de dispersión para examinar cuántos componentes principales eran necesarios para representar las relaciones entre las muestras.

Se ajustaron modelos lineales mixtos a cada marcador de forma independiente, utilizando un umbral de significancia de 0,0005 para identificar los marcadores con alta predictibilidad. La lista de marcadores candidatos se redujo aún más buscando colinealidad e identificando marcadores con información redundante o si eran completamente colineales con un marcador independiente.

9. Resultados

Matrices de relación genómica

Entre los 33 clones genotipados, había siete subgrupos con valores altos de parentesco. Estos son: [5M, 2M, 1M], [BA2, BA1, BA21], [14CM, 11C], [26ECO, 22ECO, 31ECO], [30, 21ECO], [12CM, 2], y [3M, 4, 4M] (Figura 1). Entre los 26 clones genotipados con valores de rasgos fenotípicos, sólo había 5 subgrupos, cuyos valores correlación se indican en la Figura 2.

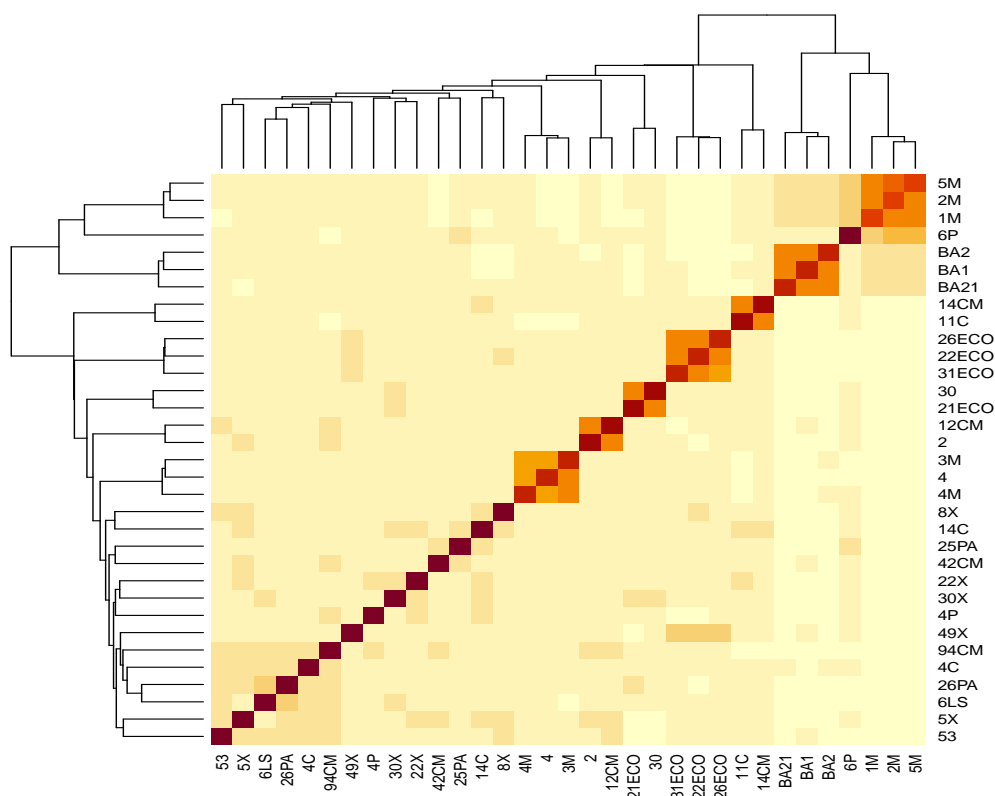


Figura 1. Matriz de relación genómica entre los 33 clones de teca genotipados en GENFORES Matriz de relación genómica entre los 33 clones genotipados de teca en GENFORES, Costa Rica.

Los valores diagonales de la GRM para 2M, y 5M, fueron 1,23 en promedio, lo que sugiere un grado alto de endogamia. Esto podría explicar por qué los elementos fuera de diagonal entre 2M, 1M, y 5M son sustancialmente mayores al valor 0,5 a pesar de que presumiblemente son hermanos completos. El clon 6P es aparentemente medio hermano de 2M, 1M y 5M. Los siguientes conjuntos de clones son aparentemente hermanos completos, con diagonales de exclusión alrededor de 0,5: [BA1, BA2, y BA21], [22ECO, 26ECO, y 31ECO], y [30,21ECO]. Además, 3M, 4 y 4M también son probablemente hermanos completos.

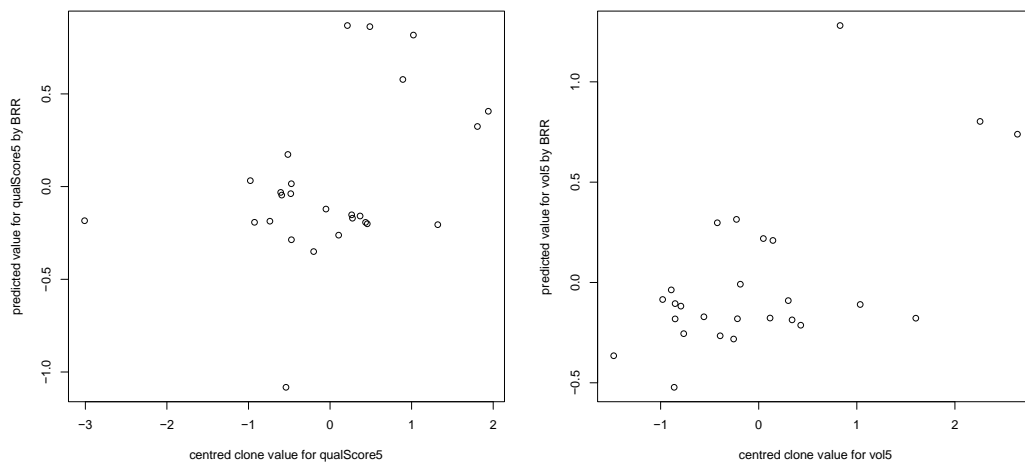


Figura 3. Relaciones entre el valor estandarizado de clones de teca y su predicción genómica para (A) calidad del árbol y (B) volumen con Regresión Bayesiana Ridge.

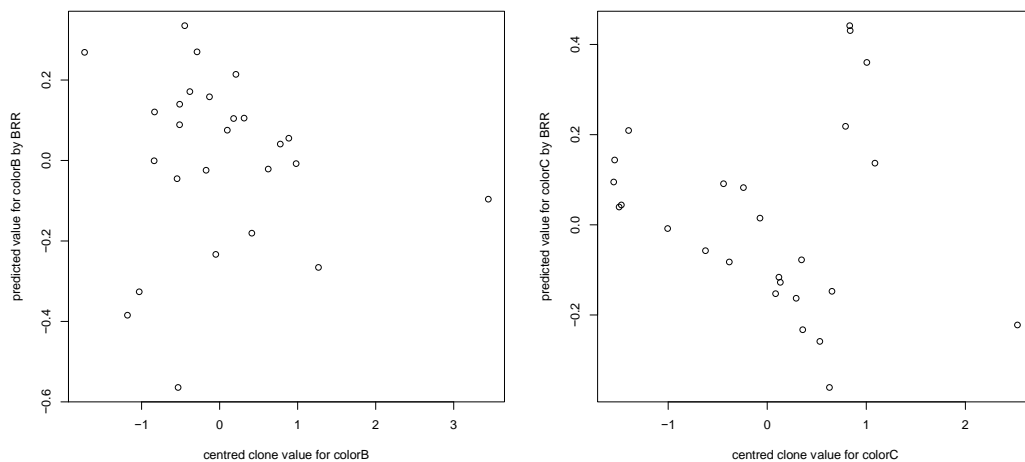


Figura 3. Relaciones entre valor clonal estandarizado y su predicción genómica para (A) color de duramen B, y (B) color de duramen C con regresión Bayesiana Ridge.

Se trata de un resultado prometedor. Por ejemplo, si un miembro de GENFORES secuencia 100 árboles plus (basado en su valor fenotípico) antes de la captura y ensayo de clones, la selección genómica de los 20 mejores clones para adquisición probablemente produciría 12 de los 20 mejores clones reales para calidad de árbol, volumen y DAP, y 8 de los 20 mejores clones reales para gravedad específica y porcentaje de duramen.

La capacidad de predicción fue numéricamente negativa para el color de la madera, pero esto se debe probablemente a la aleatoriedad en la relación entre la predicción genómica y el valor del clon (Figuras 4). Nótese que la escala de los valores

genómicos para estos rasgos de color (valores del eje y) era aproximadamente la mitad de la escala de los otros rasgos, lo que indica que hay menos varianza en los valores de predicción genómica.

La inclusión de la GRM en las predicciones bayesianas no cambió la PA en más de 0,01 (resultados no tabulados), ya que había relativamente pocas relaciones entre los clones.

De los 33 genotipos originales, sólo 26 eran comunes a los conjuntos genotipados y fenotipados. Las relaciones entre los clones se determinaron utilizando el paquete ASRgenomics en R. Se utilizó el paquete BGLR en R para ajustar Bayes A, B, C, Lasso, Ridge y la regresión BRR. La capacidad de predicción se determinó mediante validación cruzada, a través de correlaciones entre valores clonados individualmente predichos y observados.

Los resultados de la predicción genómica nos dieron un BRR de 0,66 para el DAP, 0,6 para el volumen y 0,59 para la gravedad específica. El análisis de asociación genómica (GWAS) dio como resultado marcadores SNPs significativos para calidad del tallo, volumen, DAP, porcentaje de duramen, gravedad específica y color del duramen. Como rasgos más prometedores por GWAS, el volumen registró una tasa de falsos descubrimientos del 51%, con una ganancia de selección genómica/clonal del 97%. La gravedad específica, una tasa de falsos descubrimientos del 57% y una ganancia de selección genómica del 89%. El color del duramen, una tasa de falsos descubrimientos del 47% y una ganancia de selección genómica del 96%.

El scree plot (gráfico lineal de los eigenvalues de componentes principales) indicó que cinco componentes principales describirían adecuadamente las relaciones entre los individuos (Figura 5). Sin embargo, teniendo en cuenta el tamaño total de la muestra ($n=26$), la estructura de la población también podría estar representada por los dos primeros vectores, que separaban de forma efectiva 4 de las pequeñas familias full-sib identificadas anteriormente de la quinta familia (30, 21ECO) y de los clones no relacionados (Figura 6). Cada modelo GWAS se ejecutó tanto con 2 como con 5 componentes principales y se retuvo el modelo con mejores resultados.

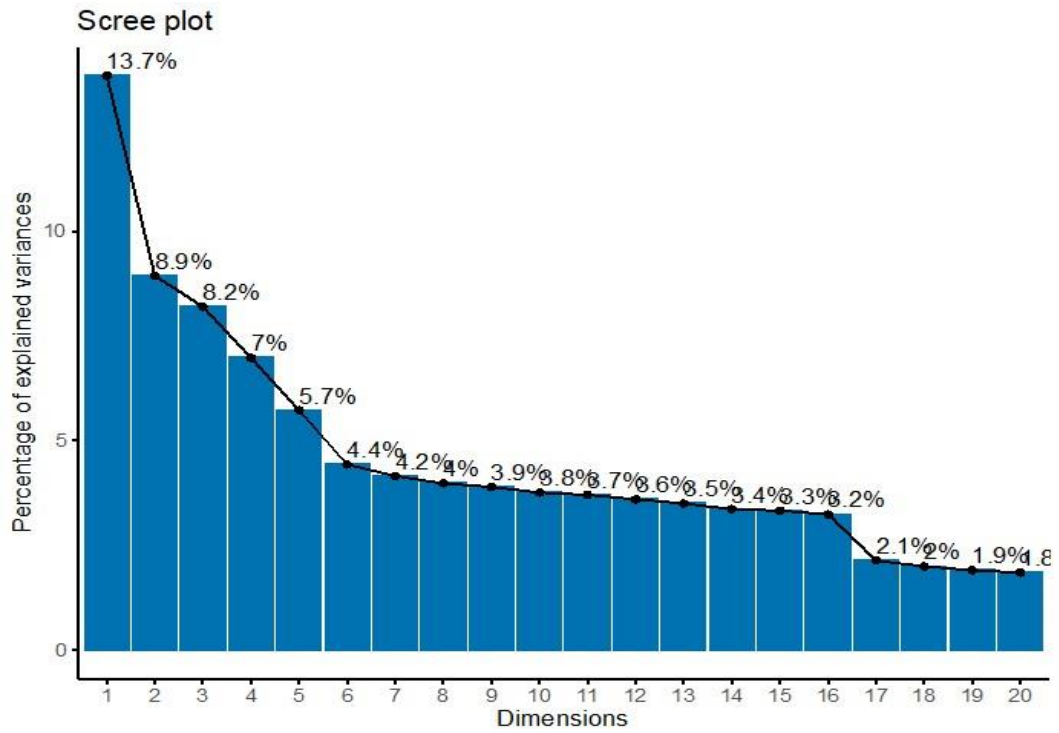


Figura 5. Scree plot del porcentaje de varianza explicada para cada dimensión de la matriz Q. Idealmente, las cinco primeras dimensiones se incluirían en GWAS para representar la estructura de la población, correspondiente al primer punto de inflexión de la curva.

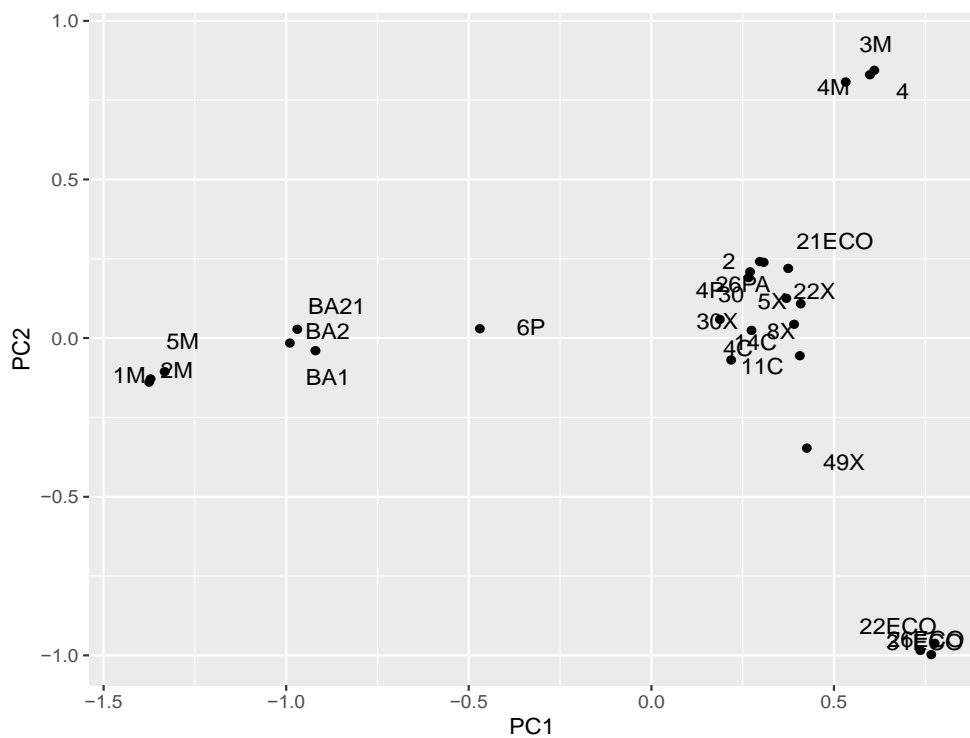


Figura 6. Diagrama de los dos primeros componentes principales de la matriz Q que

describe las relaciones entre las muestras. Obsérvese la separación de las familias de hermanos completos identificadas previamente en la GRM.

Asociaciones de marcadores

Se descubrieron asociaciones significativas de marcadores para 6 de los 8 rasgos (Cuadro 2). El descubrimiento de marcadores se optimizó utilizando las 2 primeras dimensiones de la matriz de estructura de la población Q para 3 rasgos y utilizando 5 dimensiones de Q para 3 rasgos (Cuadro 2). Los detalles de los marcadores significativos se presentan en el Cuadro 3 y se representan en la Figura 7 mediante diagramas de Manhattan.

Cuadro 2. Resumen de los resultados del GWAS. Resumen de los resultados del GWAS

Rasgo	Marcadores Significativos	N (Q dimensiones)	FDR	GS gain/Pheno gain
Quality Score	4 (4)	2	128%	25%
VOL	10 (7)	2	51%	97%
DBH	8 (7)	5	64%	50%
Specific Gravity	9 (8)	5	57%	89%
Heartwood %	0	NA	NA	NA
Heartwood Color A	11 (5)	5	47%	96%
Heartwood Color B	0	NA	NA	NA
Heartwood Color C	1 (1)	2	513%	69%

Número de marcadores significativos a $p < 0,0005$ (marcadores únicos entre paréntesis), número de dimensiones retenidas en la matriz Q de estructura de la población, tasa estimada de falsos descubrimientos (FDR) y ganancia de selección genómica seleccionando los 4 mejores clones mediante selección asistida por marcadores como porcentaje de la ganancia seleccionando los 4 mejores clones mediante evaluación fenotípica.

Cuadro 3. Marcadores genéticos asociados significativamente con 8 rasgos de teca por medio del método GWAS

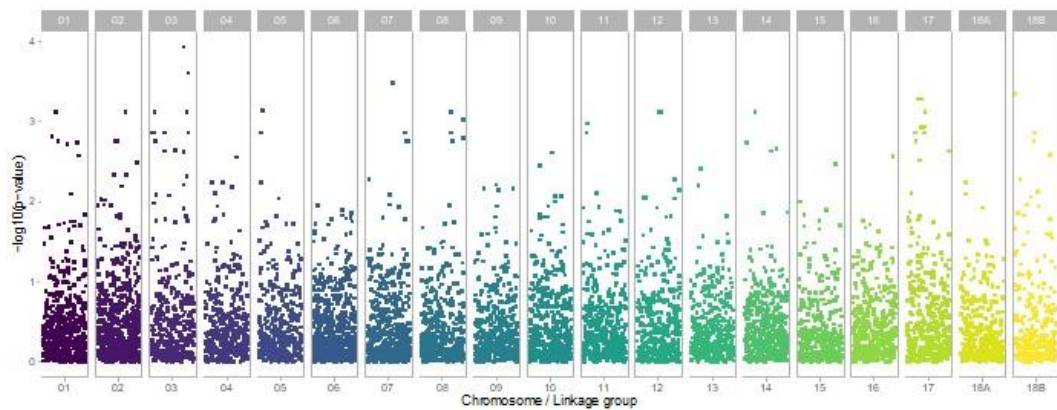
Marcador	MAF	Effect	SE(Efecto)	P value	Colinealidad Evaluación ¹
Calidad Árbol Puntuación					
CHR_03.14422001.GA	0.12	3.79	0.81	1.16E-04	Independent
CHR_03.15369675.TA	0.10	3.96	0.91	2.46E-	significantly

				04	collinear
CHR_07.7671436.AG	0.12	-3.76	0.88	3.22E-04	significantly collinear
CHR_19.431712.TC	0.10	-3.77	0.91	4.43E-04	significantly collinear
Volumen					
CHR_06.12288128.GA	0.13	0.019	0.004	2.84E-04	significantly collinear
CHR_07.4556893.AG	0.08	0.024	0.003	5.49E-09	Independent
CHR_09.11036451.TA	0.12	0.017	0.004	4.19E-04	significantly collinear
CHR_09.11036577.GA	0.12	0.017	0.004	4.19E-04	completely redundant
CHR_09.11077265.GA	0.10	0.022	0.004	7.57E-05	significantly collinear
CHR_10.1504347.TG	0.12	0.020	0.003	4.16E-07	significantly collinear
CHR_10.14147973.GT	0.08	0.019	0.004	4.03E-04	significantly collinear
CHR_15.4305191.TC	0.12	0.020	0.003	4.16E-07	completely redundant
CHR_16.11278690.CG	0.12	0.020	0.003	4.16E-07	completely redundant
CHR_19.1052510.GA	0.17	0.017	0.004	4.07E-04	significantly collinear
CHR_06.12288128.GA	0.13	0.019	0.004	2.84E-04	significantly collinear
DAP (a la altura del pecho)					
CHR_01.15809500.GT	0.23	0.75	0.17	2.86E-04	Independent
CHR_03.2135818.TA	0.38	-0.75	0.18	4.38E-04	significantly collinear
CHR_03.2135833.AC	0.42	-0.70	0.17	4.57E-04	significantly collinear
CHR_03.2135843.GA	0.42	-0.70	0.17	4.57E-04	completely redundant
CHR_04.99602.AG	0.15	0.96	0.19	5.93E-05	significantly collinear
CHR_04.2520866.CT	0.17	0.72	0.17	4.09E-04	significantly collinear
CHR_08.6439791.TC	0.08	-1.18	0.24	8.92E-05	Independent
CHR_17.11930769.AC	0.48	-0.74	0.16	1.90E-04	significantly collinear
Gravedad Específica					
CHR_01.17266971.AG	0.15	-	0.005	6.69E-	Independent

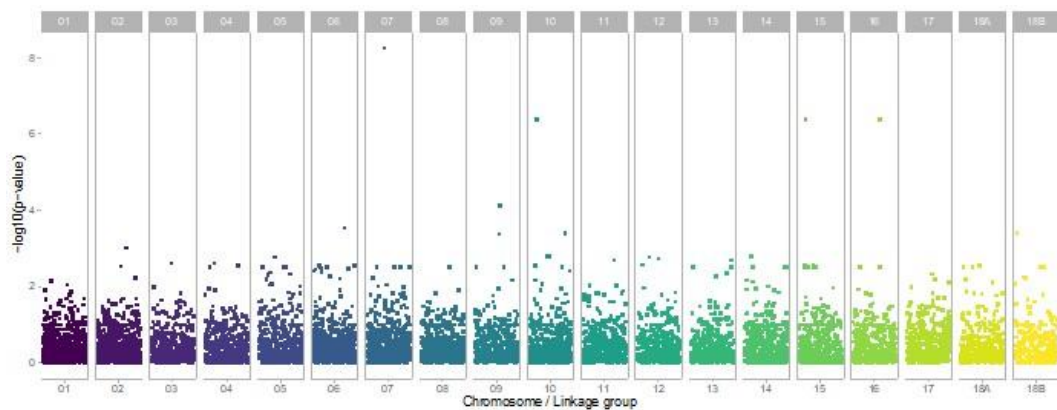
			0.025		05	
CHR_01.17267008.TC	0.15	-	0.025	0.005	6.69E-05	completely redundant
CHR_04.2836137.TG	0.10	-	0.019	0.004	7.80E-05	significantly collinear
CHR_05.4640519.GA	0.13		0.018	0.004	2.41E-04	Independent
CHR_05.8558177.TC	0.17		0.019	0.003	2.87E-05	significantly collinear
CHR_08.11098790.GT	0.17	-	0.014	0.003	4.08E-04	significantly collinear
CHR_09.16115685.AG	0.13	-	0.018	0.004	3.98E-04	significantly collinear
CHR_15.8108010.TA	0.12	-	0.016	0.004	4.48E-04	significantly collinear
CHR_17.7641365.GA	0.10		0.016	0.004	4.08E-04	significantly collinear
Porcentaje de Duramen						
Nil						
Color Duramen A						
CHR_01.17606298.TA	0.31		0.68	0.16	4.91E-04	Independent
CHR_01.17606300.AC	0.31		0.68	0.16	4.91E-04	completely redundant
CHR_01.17606301.AT	0.31		0.68	0.16	4.91E-04	completely redundant
CHR_01.17606320.CT	0.31		-0.68	0.16	4.91E-04	completely redundant
CHR_01.17606326.CT	0.31		-0.68	0.16	4.91E-04	completely redundant
CHR_01.17606379.AT	0.31		-0.68	0.16	4.91E-04	completely redundant
CHR_03.13448382.TC	0.15		0.70	0.16	3.32E-04	significantly collinear
CHR_04.1682230.GA	0.12		0.98	0.20	7.93E-05	marginally significantly collinear
CHR_04.1682236.GA	0.12		0.98	0.20	7.93E-05	completely redundant
CHR_14.14799348.TC	0.37		0.64	0.14	1.52E-04	Independent
CHR_15.12614645.AC	0.23		-1.32	0.31	3.94E-04	significantly collinear
Heartwood Colour B						
Nil						
Heartwood Colour C						
CHR_10.4047519.TC	0.13		0.92	0.22	3.94E-04	NA

La colinealidad afecta a la mayoría de los marcadores descubiertos (Cuadro 3), en parte porque hay muy pocas muestras en este estudio, y en parte debido al desequilibrio de ligamiento cuando los marcadores colineales están muy próximos entre sí. Por ejemplo, los 6 primeros marcadores significativos para el Color A del duramen en el cuadro 3.

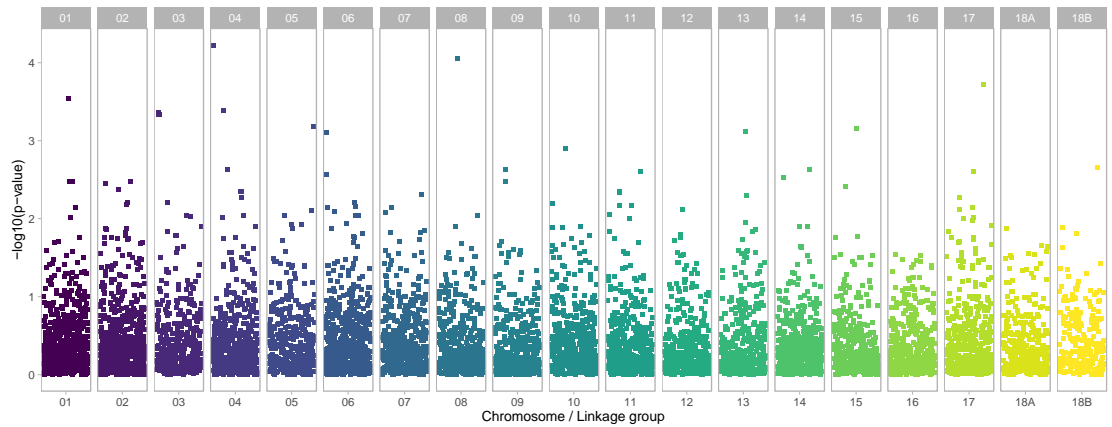
Puntuación de la calidad del árbol



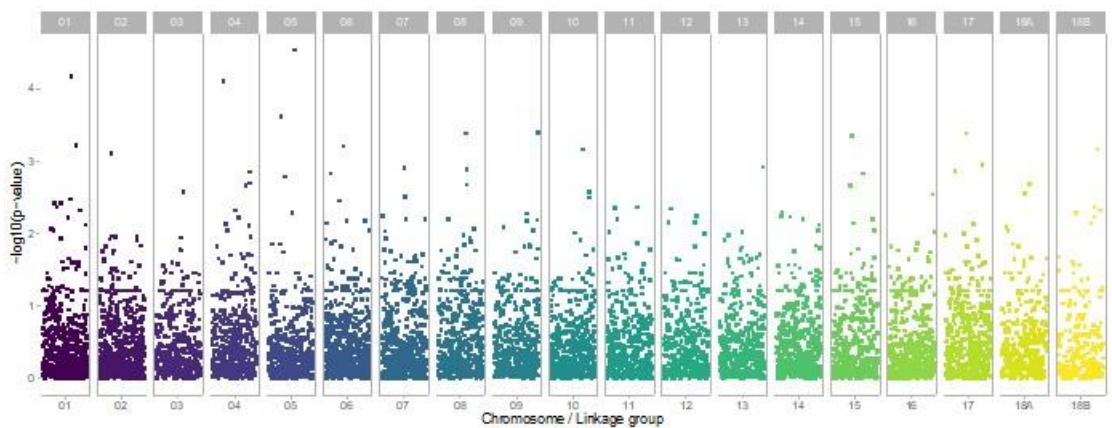
Volumen comercial



DAP



Gravedad específica



Color A del Duramen

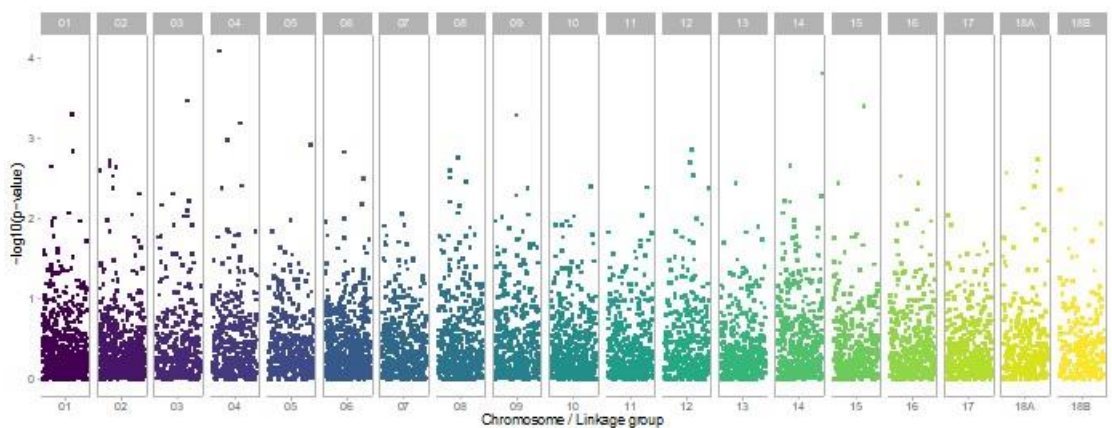


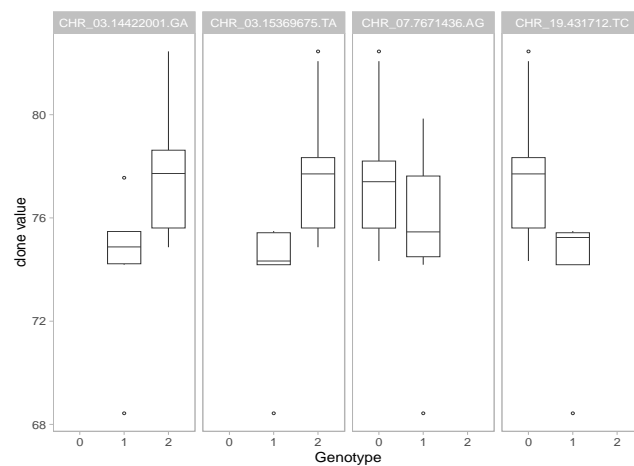
Figure 7. Gráficos Manhattan para 6 rasgos con asociación significativa con marcadores moleculares SNPs. La ruptura de la línea puntuada indica el valor del umbral de significancia al nivel de 0,0005.

Los gráficos de caja de la Figura 8 representan los efectos para cada genotipo de los marcadores con asociaciones significativas entre el marcador-rasgo. Incluyen

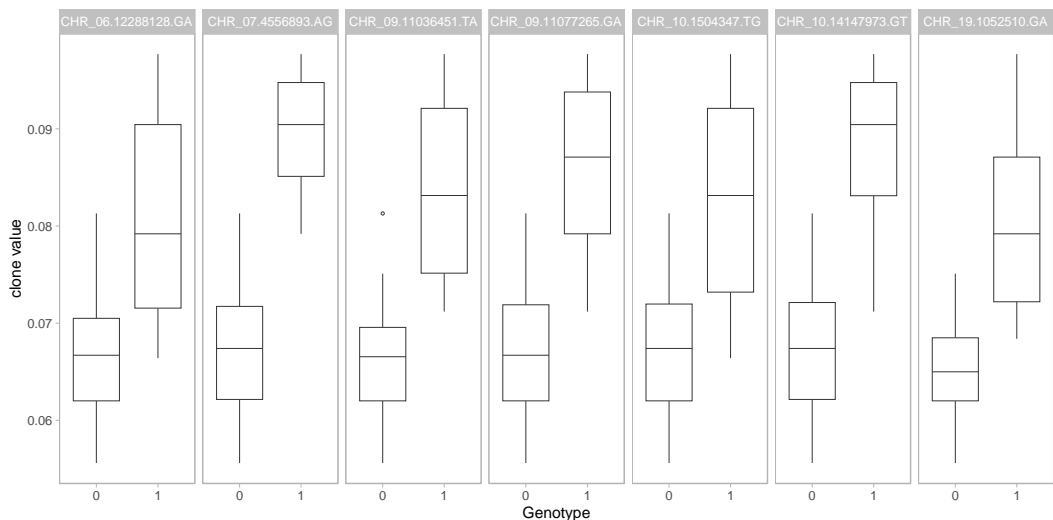
todos los marcadores del cuadro 3 excepto los etiquetados como "completamente redundantes" en la última columna. Los índices de selección genómica se calcularon para cada rasgo y clon utilizando los efectos de los marcadores enumerados en el cuadro 3 y los genotipos de cada clon respectivo (Figura 9).

La ganancia en el valor del clon mediante la selección de los 4 mejores clones por índice de selección genómica se comparó con la ganancia por selección directa en el valor del clon. Estos valores oscilaron entre el 25% para la puntuación de calidad del árbol (ya que promediaron los 17 clones con igual índice de selección genómica) y el 97% para el volumen comercial, donde los 3 mejores clones para el índice de selección genómica fueron también los tres mejores para el valor clonal observado (véase la Figura 9).

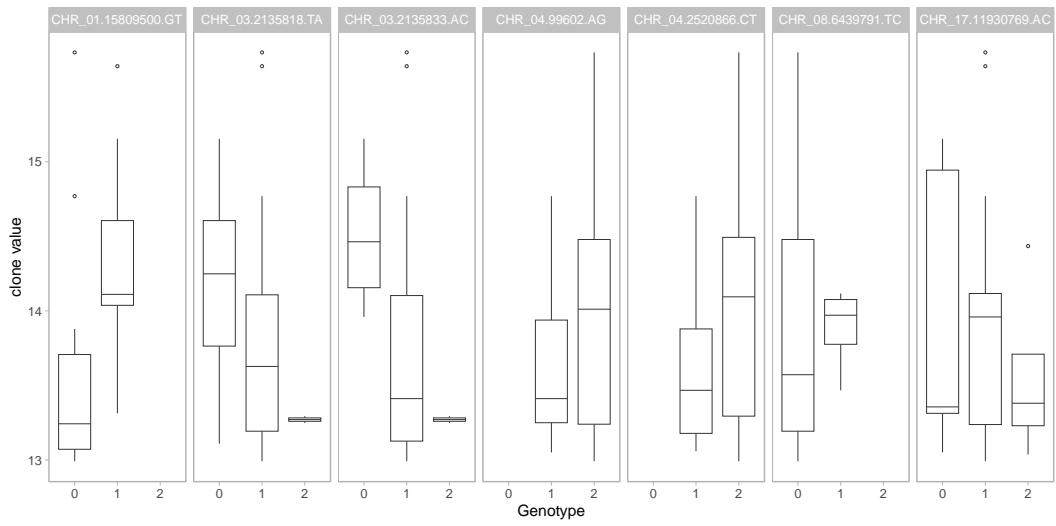
Calidad del fuste



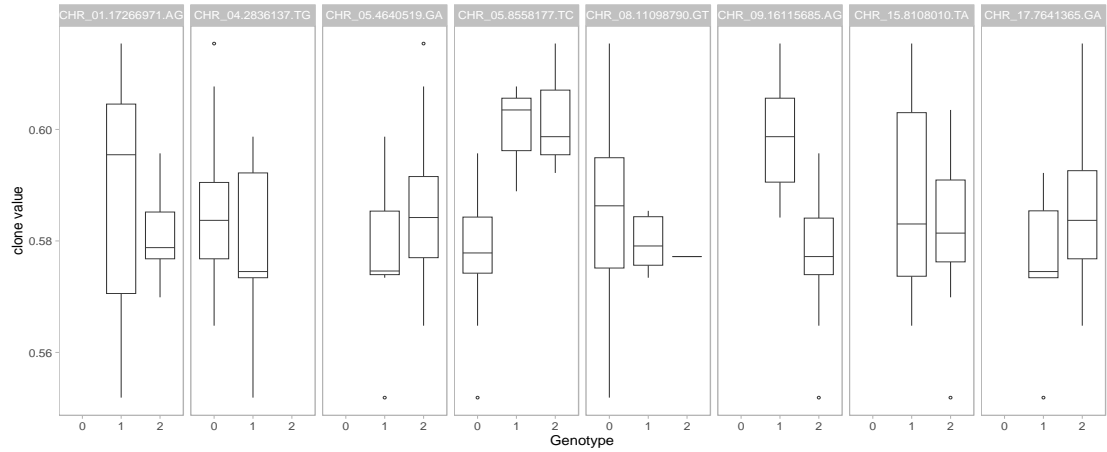
Volumen comercial



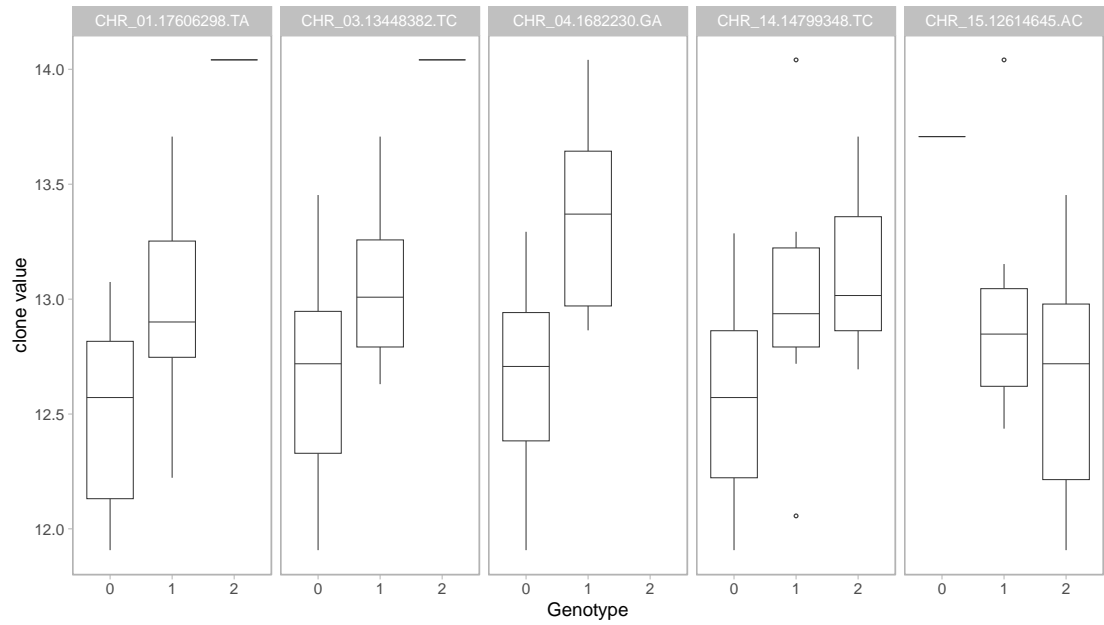
DAP



Gravedad específica



Colour A del duramen



Color C del duramen

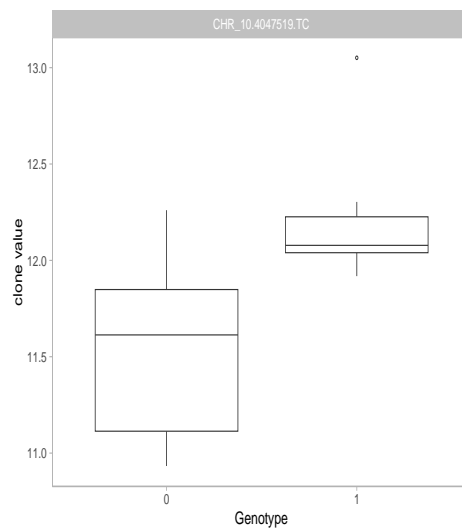


Figura 8. Gráficos de caja para mostrar el efecto del genotipo (horizontal) en asociación significativa con el valor genómico de los marcadores genéticos (vertical).

En la Figura 9 se puede observar el resultado del uso de índices de predicción genómica versus el valor genético observado de cada clon.

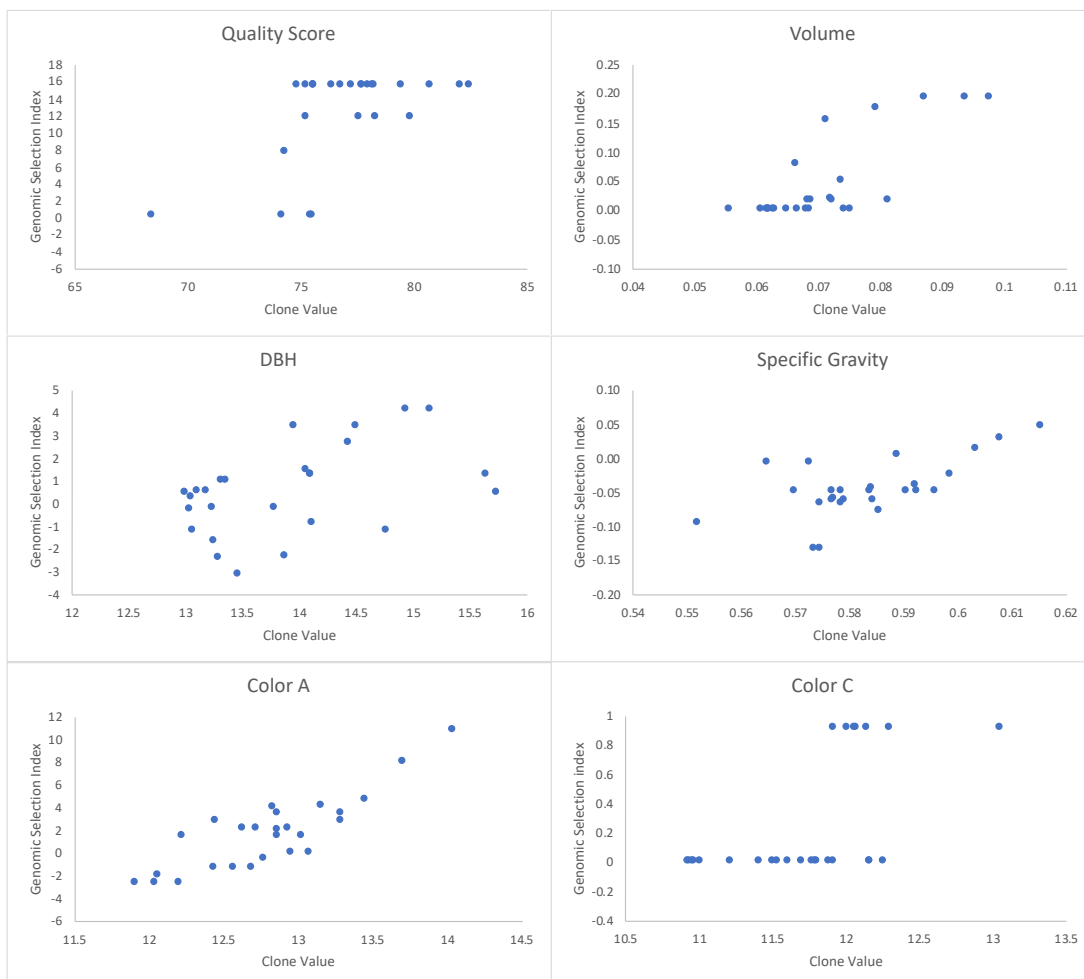


Figura 9. Relación entre el índice de selección genómica (basado en el valor del efecto para cada marcador, ver cuadro 3) versus el valor genético observado de cada clon.

10. Discusión

Esta investigación puede considerarse una exploración preliminar del potencial de la selección genómica en teca. El trabajo futuro se centrará en aumentar el número de clones genotipados y sitios de evaluación, combinar los enfoques de predicción bayesiana y GWAS en un modelo unificado y, anotar marcadores significativos para descubrir genes con funciones conocidas. Los dos enfoques de predicción (modelos genómicos bayesianos y asociaciones marcador-rasgo) pueden combinarse en un único marco de predicción, como demostraron Ballesta et al. (2020). Podría merecer la pena explorar esto en un próximo paso utilizando el conjunto de datos actual o uno mejorado con un mayor número de genotipos.

Aunque en la bibliografía brillan por su ausencia estudios similares, este trabajo se basó en un número muy reducido de muestras genotipadas (26 individuos), por lo que su potencialidad queda sustancialmente limitada. No obstante, los resultados obtenidos son muy prometedores. Las estimaciones de capacidad predictiva de entre 0,40 y 0,66 para la estimación de la calidad del tronco, el DAP, la gravedad específica del volumen comercial y el porcentaje de duramen, son valiosas en el contexto del mejoramiento genético forestal.

Los resultados sugieren un fuerte potencial para la selección clonal asistida por marcadores asociados al crecimiento, gravedad específica y color del duramen. En el caso del color del duramen "A" es particularmente interesante, ya que no hay capacidad predictiva para el rasgo utilizando los modelos genómicos bayesianos. Sin embargo, la selección de cinco marcadores por sí sola parece ser muy eficaz. Esto sugiere quizás que este atributo del color del duramen está controlado por un pequeño número de genes, supuestamente en los cromosomas 1, 3, 4, 14 y 15 (Figuras 7 y 8).

A pesar de las dificultades causadas por la pandemia y la interdependencia con el apoyo en secuenciación con la Universidad Estatal de Carolina del Norte, el proyecto logró cumplir con todos sus objetivos propuestos, incluso un paso más al lograr la asociación de los SNP's con 6 rasgos de importancia económica.

11. Conclusiones generales

Se concluye que en el genoma de la teca existen variantes de un solo nucleótido (SNPs por sus siglas en inglés) distribuidos uniformemente y en suficiente cantidad para permitir la identificación precisa de marcadores asociados a características de interés.

Con base en 26 arboles élite de teca secuenciados, se logró determinar preliminarmente la presencia de más de 10 800 SNP's, de los cuales 43 exhibieron una alta correlación genómica con 6 rasgos funcionales: tasa de crecimiento del DAP, volumen comercial, calidad del fuste, densidad de la madera, proporción de duramen y color del duramen. Los valores de predicción genómica de estos rasgos funcionales oscilaron preliminarmente entre un 50 y un 60% de probabilidad de certeza.

Estos primeros resultados auguran una alta probabilidad de selección genómica temprana en genotipos élite de teca. Existe un gran potencial para la selección clonal asistida por marcadores de crecimiento, gravedad específica y color del duramen A. El atributo del color del duramen está probablemente controlado por un grupo de genes, supuestamente en los cromosomas 1, 3, 4, 14 y 15.

12. Recomendaciones generales

Se recomienda ampliar este estudio a un mayor número de árboles para aumentar la potencia de detección de asociaciones significativas entre marcadores y rasgos y mejorar las estimaciones de precisión de la predicción. También se recomienda la anotación funcional de los marcadores significativos aquí descubiertos.

Los modelos genómicos bayesianos y las asociaciones marcador-rasgo pueden combinarse en un único marco de predicción en futuros estudios.

Antes de continuar con el desarrollo de los SNPs en nuevos marcadores genéticos, es necesario esperar hasta mejorar los valores de predicción genómica con base en una más amplia secuenciación poblacional.

Mientras se continúa con el desarrollo de los SNPs en nuevos marcadores genéticos, es recomendable continuar afinando y optimizando el uso de los microsatélites existentes en el mercado.

Se recomienda continuar con la gestión de fondos para ampliar la base poblacional de secuenciación. Para esto se debe volver a formular nuevos proyectos y buscar la colaboración del sector privado forestal. Al respecto se debe mencionar que se logró crear un nuevo proyecto con el apoyo de la VIE, al cual se le suman US \$3000 de la empresa BARCA en apoyo a la adquisición de reactivos y otros gastos similares. El proyecto se inició en Julio 2022 y se proyecta su conclusión en junio 2024.

13. Agradecimientos

Un agradecimiento a la VIE por el apoyo y a la Escuela de Ingeniería Forestal (EIFO) por el apoyo con la logística de aprovisionamiento y cantidad de gestiones de apoyo a todo nivel. Sin este apoyo Institucional no se podría haber logrado el desarrollo

del proyecto. De igual manera a la Escuela de Recursos Naturales de la Universidad Estatal de Carolina del Norte y a su Centro de Secuenciación por todo el apoyo en labores técnicas asociadas. No debe faltar mencionar el apoyo de los miembros de GENFORES, que nos apoyaron con fondos y nos proveyeron de muestras para obtención de ADN.

14. Referencias

Alcântara BK, Veasey JK (2013) Genetic diversity of teak (*Tectona grandis* L.F.) from different provenances using microsatellite markers. *Rev Árvore* 37(4):747–758. <https://doi.org/10.1590/S0100-67622013000400018>

Alvarado, A., Mata, R. 2013. Chapter 5. Condiciones de sitio y la silvicultura de la teca. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 54-83 p

Ansari SA, Narayanan C, Wali SA, Kumar R, Shukla N, Rahangdale SK (2012) ISSR markers for analysis of molecular diversity and genetic structure of Indian teak (*Tectona grandis* L.f.) populations. *Ann For Res* 55:11–23. <https://doi.org/10.15287/afr.2012.71>

Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., Rocha, O. Woolbright, S., Keim, P. 2005. Possibilities of breeding teak (*Tectona grandis* L.f.) in Costa Rica assisted by AFLP markers. *Kuru*, vol. 2, no. 5, pp. 1-8, 2005.

Badilla, Yorleny; Murillo, Olman; Xavier, Aloisio; Nogueira de Paiva, Haroldo. 2016. IBA efficiency on mini-cutting rooting from teak (*Tectona grandis* Linn F.) clones. *Rev. Árvore (Brasil)* 40 (3): 477-485.

Balakrishnan S, Dev SA, Sakthi AR, Vikashini B, Bhasker RT, Magesh NS, Ramasamy Y (2021) Gene-ecological zonation and population genetic structure of *Tectona grandis* L.f. in India revealed by genome-wide SSR markers. *Tree Genet Genomes* 17:3. <https://doi.org/10.1007/s11295-021-01514-x>

Callister, A. N., Collins, SL. (2013). Genetic parameter estimates in a clonally replicated progeny test of teak (*Tectona grandis* Linn. f.)). *Tree Genetics and Genomes* 2008 (4): 237-245.

de Oliveira PN, Matias F, Galeano E, Carrer H (2021) Functional genomics of teak. In: Ramasamy Y, Galeano E, Win TT (eds) *The Teak Genome Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham, pp 253–265.

Desta, Z. A., & Ortiz, R. (2014). Genomic selection: genome-wide prediction in plant improvement. *Trends in plant science*, 19(9), 592-601.

Diningrat, DS, Widiyanto SM, Pancoro A, Shim D, Panchangam B, Zembower N, Carlson JE (2015) Transcriptome of teak (*Tectona grandis*, L.f) in Vegetative to Generative Stages Development. *J Plant Sci* 10:1–14. <https://doi.org/10.3923/jps.2015.1.14>

Dunker B, Dormontt EE, Dijk KV, Dixon RRM, Jardine DI, Kireta D, Nurtjahjaningsih

- ILG, Win TT, Rimbawanto A, Lowe AJ (2020) A set of 156 SNP markers for teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *Conserv Genet Resour* 12:205–207. <https://doi.org/10.1007/s12686-019-01099-7>
- Fofana IJ, Lidah YJ, Diarrassouba N, N'guetta SPA, Sangare A, Verhaegen D (2008) Genetic structure and conservation of Teak (*Tectona grandis*) plantations in Cote d'Ivoire, revealed by site specific recombinase (SSR). *Trop Conserv Sci* 1(3):279–292. <https://doi.org/10.1177/194008290800100308>
- Fofana, I. J., Ofori, D., Poitel, M., & Verhaegen, D. (2009). Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* Lf) in its natural range using DNA microsatellite markers. *New forests*, 37(2), 175-195.
- Galeano, E., Vasconcelos, T. S., Ramiro, D. A., De Martin, V. D. F., & Carrer, H. (2014). Identification and validation of quantitative real-time reverse transcription PCR reference genes for gene expression analysis in teak (*Tectona grandis* Lf). *BMC research notes*, 7(1), 464.
- Galeano E, Vasconcelos TS, Vidal M, Mejia-Guerra MK, Carrer H (2015) Large-scale transcriptional profiling of lignified tissues in *Tectona grandis*. *BMC Plant Biol* 15:221. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0599-x>
- Grattapaglia, D., & Kirst, M. (2008). Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools. *New phytologist*, 179(4), 911-929.
- Grattapaglia, D., & Resende, M. D. (2011). Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes*, 7(2), 241-255.
- Goh DKS, Bacilieri R, Chaix G, Monteuis O (2013) Growth variations and heritabilities of teak CSO-derived families and provenances planted in two humid tropical sites. *Tree Genet Genomes* 9:1329–1341. <https://doi.org/10.1007/s11295-013-0642-8>
- Hansen, O. K., Changtragoon, S., Ponoy, B., Kjær, E. D., Finkeldey, R., Nielsen, K. B., & Graudal, L. (2015). Genetic resources of teak (*Tectona grandis* Linn. f.)—strong genetic structure among natural populations. *Tree genetics & genomes*, 11(1), 802.
- Hayes, B. J., Visscher, P. M., & Goddard, M. E. (2009). Increased accuracy of artificial selection by using the realized relationship matrix. *Genetics research*, 91(1), 47-60.
- Hine, A.; Rojas, A.; Suárez, L.; Murillo, O.; Espinoza, M. 2019. Optimization of Pollen Germination in *Tectona grandis* (teak) for breeding programs. *Forests* 10, 908. <https://doi.org/10.3390/f10100908>
- Huang GH, Liang KN, Zhou ZZ, Xu JM, Ma HM (2015) Genetic variation and origin of teak (*Tectona grandis* L.f.) native and introduced provenances. *Silvae Genet* 64:33–46. <https://doi.org/10.1515/sg-2015-0003>
- Huang GH, Liang KN, Zhou ZZ, Ma HM (2016) SSR genotyping—genetic diversity and fingerprinting of teak (*Tectona grandis*) clones. *J Trop For Sci* 28:48–58. <https://www.jstor.org/stable/43748078>.
- Hurtado FM, Pinto MDS, Oliviera PN, Riano Pachon DM, Inocente LB, Carre H (2020) Analysis of NAC domain transcription factor genes of *Tectona grandis* L.f. involved in secondary cell wall deposition. *Genes* 11:20.

<https://doi.org/10.3390/genes11010020>

Isik, F., Holland, J., & Maltecca, C. (2017). Genetic data analysis for plant and animal breeding. Springer.

Jiménez, J.P. Murillo, O., Shear, T.H., Whetten, R.W. 2017. Next-generation sequencing technologies in tree improvement and conservation genetics of *Dipteryx oleifera* Benth. Poster presented at: Treenomics - From Genomics Information to Business Opportunities. The 2017 Marcus Wallenberg Prize Symposium; Oct. 27, 2017; Stockholm, Sweden.

Kaosa-ard, A., Suangtho, V., & Kjaer, E. D. (1998). Genetic improvement of teak (*Tectona grandis*) in Thailand. *Forest Genetic Resources*, 26, 21-29.

Keogh, R. 2013. La teca y su importancia económica a nivel mundial. En: de Camino & Morales (eds.). Las plantaciones de teca en América Latina. Mitos y realidades. 8-28 p.

Kertadikara AWS, Prat D (1995) Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* L.f) provenances. *Theor. Appl. Genet.* 90:803–810. <https://doi.org/10.1007/BF00222015>

Lyngdoh N, Joshi G, Ravikanth G, Vasudeva R, Shaanker RU (2013) Changes in genetic diversity parameters in unimproved and improved populations of teak (*Tectona grandis* L.f.) in Karnataka state. *India J Genet* 92:141–145. <https://doi.org/10.1007/s12041-013-0226-2>

Metzker, M. Sequencing technologies - the next generation. *Nature Reviews | Genetics*, vol. 11, pp. 31-46, 2010.

Minn Y, Prinz K, Finkeldey R (2014) Genetic variation of teak (*Tectona grandis* Linn.) in Myanmar revealed by microsatellite markers. *Tree Genet Genomes* 10:1435–1449. <https://doi.org/10.1007/s11295-014-0772-7>

Minn Y, Gailing O, Finkeldey R (2016) Genetic diversity and structure of teak (*Tectona grandis* L. f.) and dahat (*Tectona hamiltoniana* Wall.) based on chloroplast microsatellites and Amplified Fragment Length Polymorphism markers. *Genet Resour Crop Evol* 63:961–974. <https://doi.org/10.1007/s10722-015-0293-8>

Monteuuis O, Goh DKS, Garcia C, Alloysius D, Gidiman J, Bacilieri R, Chaix G (2011) Genetic variation of growth and tree quality traits among 42 diverse genetic origins of *Tectona grandis* planted under humid tropical conditions in Sabah, East Malaysia. *Tree Genet Genomes* 7:1263–1275. <https://doi.org/10.1007/s11295-011-0411-5>

Moya R, Calvo-Alvarado J (2012) Variation of wood color parameters of *Tectona grandis* and its relationship with physical environmental factors. *Ann for Sci* 69:947–959. <https://doi.org/10.1007/s13595-012-0217-0>

Moya, Róger; Marín, J.D.; Murillo, O.; Leandro, Laura. 2013. Wood physical properties, color, decay resistance and stiffness in *Tectona grandis* clones with evidence of genetic control. *Silvae Genetica* 62(3):142-152.

Murillo, O.; Wright, J.; Monteuuis, O.; Montenegro, F. 2013. Capítulo 6: Mejoramiento genético de la teca en América Latina. En: De Camino, R.; Morales, J.P. (eds). *Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades. Boletín Técnico 397. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 86-111 p*

Murillo O, Resende, M.D.V. de, Badilla Y, Gamboa JP. 2019. Genotype by

- environment interaction and selection in teak (*Tectona grandis* L.) in Costa Rica. *Silvae Genetica*. (68):116-121.
- Narayanan C, Wali SA, Shukla N, Kumar R, Mandal AK, Ansari SA (2007) RAPD and ISSR markers for molecular characterization of teak (*Tectona grandis*) plus trees. *J Trop for Sci* 19:218–225.
- Narayanan C, Chawhaan PH, Mandal AK (2009) Inheritance pattern of growth and wood traits in teak (*Tectona grandis* L.f.). *Silvae Genet* 58:97–101.
- Neale, D. B., & Kremer, A. (2011). Forest tree genomics: growing resources and applications. *Nature Reviews Genetics*, 12(2), 111.
- Prasetyo E, Indrioko S, Na'iem M, Matsui T, Matsuo A, Suyama Y, Tsumura Y (2020) Genetic diversity and the origin of commercial plantation of Indonesian teak on Java Island. *Tree Genet Genomes* 16:34. <https://doi.org/10.1007/s11295-020-1427-5>
- Palanisamy, K., Gireesan, K., Nagarajan, V., & Hegde, M. (2009). Selection and clonal multiplication of superior trees of teak (*Tectona grandis*) and preliminary evaluation of clones. *Journal of Tropical Forest Science*, 168-174.
- Putro GS, Marsoem SM, Sulisty J, Hardiwinoto S (2020) The growth of three teak (*Tectona grandis*) clones and its effect on wood properties. *Biodiversitas* 21:2814–2821. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d210658>
- Quiala, E., Cañal, M. J., Rodríguez, R., Yagüe, N., Chávez, M., Barbón, R., & Valledor, L. (2012). Proteomic profiling of *Tectona grandis* L. leaf. *Proteomics*, 12(7), 1039-1044.
- Resende, M. (2016). Software Selegen-REML/BLUP: a useful tool for plant breeding. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, 16, 330-339. <https://doi.org/10.1590/1984-70332016v16n4a49>
- Swathi, B., Ramasamy, Y. Arun De, S. 2023. An overview of teak genetic improvement towards conservation of genetic resources in a changing climate with special emphasis on India. *Tree Genes and Genomes Tree Genetics & Genomes*: 19:29.
- Thogthawee, S., Volkaert, H. Analysis of teak (*Tectona grandis*) genome and its diversity. In: 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference, Chiang Rai, Thailand, 2014.
- Thwe-Thwe-Win, Hirao T, Watanabe A, Goto S (2015) Current genetic structure of teak (*Tectona grandis*) in Myanmar based on newly developed chloroplast single nucleotide polymorphism and nuclear single sequence repeat markers. *Trop Conserv Sci* 8:235–256. <https://doi.org/10.1177/194008291500800118>
- Tripathi AM, Yadav A, Saikia SP, Roy S (2017) Global gene expression pattern in a forest tree species, *Tectona grandis* (Linn. F.), under limited water supply. *Tree Genet Genomes* 13:66. <https://doi.org/10.1007/s11295-017-1151-y>
- Vaishnav V, Wali S, Tripathi S, Negi M, Ansari S (2018) A preliminary investigation on AFLP marker-wood density trait association in teak (*Tectona grandis* L. f.). *Ann For Res* 61:49–63. <https://doi.org/10.15287/afr.2018.1018>
- Varghese M, Nicodemus A, Ramteke PK, Anbazhagi G, Bennet SSR, Subramanian K (2000) Variation in growth and wood traits among nine populations of teak in Peninsular India. *Silvae Genet* 49:201–205

- Verhaegen D, Fofana IJ, Logossa ZA, Ofori D (2010) What is the genetic origin of teak (*Tectona grandis* L.) introduced in Africa and in Indonesia? *Tree Genet Genomes* 6:717–733. <https://doi.org/10.1007/s11295-010-0286-x>
- Verhaegen D, Ofori D, Fofana I, Poitel M, Vaillant A (2005) Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn. f). *Mol Ecol Notes* 5:945–947. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2005.01124.x>
- Thakor M, Fougat RS, Kumar S, Sakure AA (2019) Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) analysis of teak (*Tectona grandis* L.) germplasm. *Ecol Genet Genomics* 12:100041. <https://doi.org/10.1016/j.egg.2019.100041>
- Thwe-Thwe-Win, Hirao T, Goto S (2016) Genetic composition of exotic and native teak (*Tectona grandis*) in Myanmar as revealed by cpSNP and nrSSR markers. *Conserv Genet* 17:251–258. <https://doi.org/10.1007/s10592-015-0777-2>
- Wanders THV, Ofori JN, Amoako A, Postuma M, Wagemaker CAM, Veenendaal E, Vergeer P (2021) Teak genetic diversity in Ghana shows a narrow base for further breeding and a need for improved international collaboration for provenance exchange. *Genet Resour* 2(4):44–54. <https://doi.org/10.42625/genresj.UGUD8568>
- Wang X, Song J, Xing JH (2020) Genome-wide identification and expression profile analysis of WRKY family genes in teak (*Tectona grandis*). *Res Sq* 1–27. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs108100/v>
- Watanabe, A., Widyatmoko, A. 2004. Discrimination of Teak (*Tectona grandis*) Plus Trees Using Selected Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Markers. *Journal of Tropical Forest Science*, vol. 16, no. 1, pp. 17-24.
- Win, T., Hirao, T. and Goto, S. 2016. Genetic composition of exotic and native teak (*Tectona grandis*) in Myanmar as revealed by cpSNP and nrSSR markers. *Conser. Genet.*, vol. 17, pp. 251-258, 2016.
- Yasodha R, Vasudeva R, Balakrishnan S, Sakthi AR, Abel N, Binai N, Rajashekar B, Bachpai VKW, Pilla C, Dev SA (2018) Draft genome of a high value tropical timber tree, teak (*Tectona grandis* L. f): insights into SSR diversity, phylogeny and conservation. *DNA Res* 25:409–419. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsy013>
- Zhao D, Hamilton JP, Bhat WW, Johnson SR (2019) A chromosome scale genome assembly of *Tectona grandis* reveals the importance of tandem gene duplication and enables discovery of genes in natural product biosynthetic pathways. *GigaScience* 8(3): giz005. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz005>

15. Anexos

Alexander Berrocal Jiménez

De: Olman Murillo Gamboa <olmuga@yahoo.es>
Enviado el: lunes, 23 de octubre de 2023 16:48
Para: Alexander Berrocal Jiménez; Andrew Callister
Asunto: Fw: Your PDF Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones has been built and requires approval

Este mensaje proviene de un remitente externo

Este mensaje vino de fuera de su organización.

Looks like I finally got it!!

Olman

----- Mensaje reenviado -----

De: Silvae Genetica <em@editorialmanager.com>

Para: Olman Murillo <olmuga@yahoo.es>

Enviado: lunes, 23 de octubre de 2023, 16:45:18 GMT-6

Asunto: Your PDF Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones has been built and requires approval

Dear Dr. Murillo,

The PDF for your submission, "Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones" is ready for viewing.

This is an automatic email sent when your PDF is built. You may have already viewed and approved your PDF while online, in which case you do not need to return to view and approve the submission

Please go to <https://www.editorialmanager.com/silge/> to approve your submission.

Username: OlmanMurillo

If you do not know your confidential password, you may reset it by clicking this link:

<https://www.editorialmanager.com/silge/l.asp?i=2077&l=KR56ZGBN>

Your submission must be approved in order to complete the submission process and send the manuscript to the Silvae Genetica editorial office.

Please view the submission before approving it to be certain that your submission remains free of any errors.

Thank you for your time and patience.

Editorial Office Staff

Silvae Genetica

<https://www.editorialmanager.com/silge/>

In compliance with data protection regulations, you may request that we remove your personal registration details at any time. (Use the following URL: <https://www.editorialmanager.com/silge/login.asp?a=r>). Please contact the publication office if you have any questions.

Apéndice 1

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA
UNIVERSIDAD ESTATAL A DISTANCIA**

PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
NATURALES PARA EL DESARROLLO

ÉNFASIS: Gestión de Recursos Naturales

I Informe Escrito de Avance

**DESARROLLO DE RECURSOS GENÓMICOS PARA MEJORAMIENTO
GENÉTICO EN *Tectona grandis*.**

Alumna: Fabiana Rojas Parajeles

Tutor: Dr. Olman Murillo Gamboa

Asesor: Dr. José Pablo Jiménez

Asesor: Dr. Oscar Rocha

Noviembre 2018

Primer informe escrito de avance

Proyecto de investigación de tesis doctoral

- 1- Cumplimiento de las observaciones del tribunal realizadas en la defensa del anteproyecto de tesis.

Observaciones planteadas	Ajustes realizados	Justificación
Revisar los objetivos y la hipótesis, definir que se va a crear un borrador del genoma.	Los objetivos fueron revisados para plantear la propuesta ante la VIE.	Después de la observación realizada por el Dr. Frank Solano Campos, se indicó en el documento del anteproyecto que sería una secuencia borrador, tal y cómo fue sugerido. Sin embargo, al revisar los objetivos con el tutor y un asesor para efecto de presentar la propuesta ante la VIE, se decidió eliminar la palabra "borrador" del objetivo específico 1.
Especificar que la secuenciación Illumina ya fue realizada en la UCR y buscar cómo se realizó esa secuenciación	Se realizaron las especificaciones solicitadas en el anteproyecto y en la propuesta de proyecto ante la VIE se detalló	No se había considerado dejar claro que ya se hizo una primera secuenciación del genoma de teca. Se adjunta el reporte

(plataforma, tamaño de inserto, etc)	incluso el tamaño estimado del genoma de teca con base en el reporte generado por la empresa BGI.	generado por la empresa BGI en el que se detalla el tamaño de los insertos y la cobertura de secuenciación.
Especificar que la información de Rad-seq se usara para buscar SNPs asociados a genes diferencialmente expresados a partir de los datos de RNA-seq	En el anteproyecto se mencionó y quedó mejor detallada esta sugerencia en la propuesta presentada ante la VIE.	En la propuesta aprobada en la VIE se logra detallar y aclarar que la metodología de Rad-seq (Peterson et al. 2012) será utilizada para buscar marcadores SNPs directamente relacionados con rasgos de interés (dominancia apical), esto a partir de ADNc.
Definir el número de plantas que se usarán para rad-seq	Se definió que el número de plantas a utilizar es de 45.	Ese número se debe a que la colección de germoplasma de mayor rendimiento en el programa de mejoramiento genético de GENFORES es de 45 líneas clonales.
Subir el nivel en cuanto análisis cuantitativo de los datos y recurrir a	Se detallaron los posibles softwares a utilizar tanto para los análisis cuantitativos	No se había considerado en el anteproyecto algunos softwares importantes que se están

programas especializados	como para los datos moleculares. Se procedió a revisar y especificar en la propuesta VIE los análisis estadísticos.	utilizando actualmente en este tipo de investigaciones, ni los modelos estadísticos para analizar las observaciones fenotípicas con los datos moleculares.
--------------------------	---	--

2- Estado del arte actualizado

Tectona grandis L.f., conocida como teca, pertenece a la familia Lamiaceae. Es un árbol caducifolio grande que puede alcanzar alturas máximas de más de 40 m y diámetros de hasta 2 m (Weaver 1993). La teca es nativa de bosques deciduos del Sudeste de Asia. Se encuentra distribuida naturalmente en dos regiones principales: (1) Centro y Este de India y (2) Myanmar, Laos y Noroeste de Tailandia (Fofana *et al.* 2009), de donde fue introducida a la mayor parte de los trópicos. Hoy en día, las plantaciones de teca se pueden encontrar en Australia, Asia, África y América Latina. Es una especie ampliamente cultivada, con aproximadamente 6 millones de hectáreas plantadas en todo el mundo (Weaver 1993). La teca tiene una tasa de crecimiento moderada en plantaciones y tolera una amplia gama de condiciones climáticas, pero crece mejor en un clima cálido, húmedo y tropical.

Según la FAO (2002), en América Central la teca se introdujo por primera vez a fines de la década de 1920, pero no fue hasta la década de 1970 cuando comenzaron a aparecer las primeras plantaciones con fines comerciales. La teca se planta en todos los países de la región, tanto en la vertiente del Pacífico como en la del Caribe y en tierras bajas por debajo de los 1000 msnm. A pesar de ser uno de los países más pequeños de la región, Costa Rica lidera el mejoramiento genético y silvicultural de la especie. Esto se explica por el desarrollo de un paquete tecnológico para el establecimiento y manejo de plantaciones de teca, que ha resultado en una mayor productividad (FAO 2002; Murillo *et al.* 2013). Sin embargo, varios estudios han identificado el potencial de mejora genética en la teca para plantaciones forestales

(Kjaer & Foster 1996; Kaosa-ard *et al.* 1998; Kjaer *et al.* 2000; Assis & Resende 2011; Koskela *et al.* 2014; Murillo & Badilla 2017, Badilla & Murillo 2017).

Los programas de cultivo y mejora de árboles persiguen la identificación de genotipos superiores, es decir, individuos con características deseables superiores a la media poblacional. Esto se puede lograr mediante ciclos consecutivos de selección de árboles superiores de una población base, cruces controlados entre esos individuos y una selección adicional de su progenie. De manera alternativa, los enfoques biotecnológicos (por ejemplo, ingeniería genética, edición del genoma, secuenciación, entre otros) pueden usarse para introducir y seleccionar rasgos deseables. Mediante el uso de esas herramientas biotecnológicas, para el 2013 se reportaba 50 genomas de plantas secuenciados y dos años después esa cifra aumentó al doble (Michael & VanBuren 2015 y Michael & Jackson 2013). Este acceso a abundantes datos genómicos ha revolucionado la comprensión de las funciones de las plantas, tanto a nivel individual como poblacional. Ha permitido el descubrimiento de nuevos genes y vías metabólicas. Además, ha abierto las puertas a una nueva forma de hacer selección en programas de mejoramiento (Desta & Ortiz 2014). Sin embargo, de todos los genomas de plantas secuenciados hasta ahora, sólo unos cuantos pertenecen a especies de árboles, y de esos un grupo más pequeño representa especies maderables. Dentro de esos últimos podemos mencionar al álamo, eucalipto y pino (Neale & Kremer 2011).

En teca los cruces controlados son difíciles de lograr debido a su tamaño floral. Las flores de teca son pequeñas y perfectas (presentan pistilo y estambre), lo que dificulta su manipulación. El porte de los árboles, con su floración a más de 10-15 m de altura, dificultan enormemente las labores (Tangmitcharoen & Owens 1997). Por tanto, la estrategia de mejora en teca ha sido evaluar árboles de diferentes poblaciones a través de ensayos de procedencia - progenie o ensayos clonales, seleccionar los de mayor valor genético y conformar una subpoblación comercial con los mejores 15-20 genotipos (Murillo *et al.* 2013). En teca se ha incursionado ya en la silvicultura clonal por su mayor progreso genético. Un ejemplo exitoso de esta estrategia es presentado por Palanisamy *et al.* (2009) y Badilla y Murillo (2017).

Hay muchos rasgos que se pueden mejorar en la teca, por ejemplo, propiedades de la madera (gravedad específica, color, etc.), crecimiento en suelos degradados (alta acidez, baja fertilidad, etc.) y supervivencia de las plántulas (relacionada principalmente al daño por viento durante los primeros años después de la siembra). Sin embargo, el principal objetivo actual de muchos programas de mejoramiento en teca es mejorar rasgos de productividad y los factores que pueden afectarlo, como la salud del árbol o la resistencia a plagas y patógenos (Murillo *et al.* 2013).

La productividad, entendida aquí como el volumen total de madera comercial por unidad de área, está influenciada por varios rasgos tales como dominancia apical (relacionada con la forma del fuste), el dap y la altura comercial del árbol. La forma del fuste se ve afectada por la aparición de ramas gruesas (baja dominancia apical), aparición de gamba o aletones basales y, por bifurcaciones a baja altura (daño por viento) (Brown *et al.* 1967). La dominancia apical se refiere al control ejercido por el meristemo presente en la punta del brote o yema terminal, que suprime la expresión de los brotes laterales. Existen diferentes mecanismos involucrados en el control de la dominancia apical, sin embargo, es ampliamente aceptado que el control hormonal y la disponibilidad de nutrientes juegan un papel fundamental. Por ejemplo, las auxinas producidas en la punta del brote se mueven basípetamente hacia la parte baja del tronco e inhiben el crecimiento de brotes laterales (Cline 1991). Cuando el individuo no presenta una fuerte dominancia apical, el meristemo terminal responsable del desarrollo de la panícula, suele morir una vez concluida la fase reproductiva; con esto, dos yemas axilares asumen el liderazgo en crecimiento vegetativo conformando una bifurcación, por tanto, pérdida de altura comercial. Se ha reportado que la altura y edad de bifurcación están bajo control genético de débil a moderado y altamente correlacionadas con la edad de floración (Callister 2013). La pérdida de dominancia apical tiene por tanto repercusiones económicas y de producción de volumen comercial por árbol. Por esta razón, el alto control apical y la floración tardía se han considerado importantes objetivos de mejoramiento en la teca.

Se requiere de más investigación para comprender mejor los mecanismos de dominancia apical, de modo que se pueda incorporar en los programas de mejoramiento de la teca.

El estudio de los genes y las redes reguladoras en los árboles ha sido limitado en el pasado, principalmente por el gran tamaño del genoma, los largos ciclos de vida y la limitada base de conocimientos genéticos moleculares.

Actualmente, se han desarrollado trabajos de selección genómica con marcadores moleculares en maderables como eucaliptos en Brasil y en pinos en USA y Chile (Resende *et al.* 2012; Isik *et al.* 2016).

Por lo tanto, en el programa de mejoramiento genético de teca desarrollado por la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica, se pretende con esta investigación desarrollar recursos genómicos para el mejoramiento genético en *T. grandis*. Se pretende generar una secuencia del genoma completo de teca, identificar marcadores moleculares y analizar niveles de expresión génica en genotipos con rasgos de interés económico identificado. Con estos trabajos se pretende generar aplicaciones genómicas para apoyar a los productores de teca a nivel internacional, para que logren mejorar la eficiencia de selección genética e impactar sus ganancias en menor plazo. El Instituto Tecnológico de Costa Rica, a través de GENFORES dirigido desde su Escuela de Ingeniería Forestal, con estas investigaciones liderará a nivel internacional el campo de la genómica aplicada al cultivo de la teca. Esto permitirá aumentar la calidad de los materiales a utilizar en su cultivo, así como disminuir los riesgos de los productores con su utilización.

3- Objetivo general y específicos

Los objetivos aprobados en el anteproyecto tuvieron cambios de forma, debido a qué después de aprobado el anteproyecto se revisó en conjunto con el tutor y un asesor para plantear la propuesta de investigación ante la VIE.

Finalmente, los objetivos quedan de la siguiente manera:

Objetivo general

Desarrollar recursos genómicos para fortalecer el mejoramiento genético de *Tectona grandis*.

Objetivos específicos

1. Secuenciar el genoma de *T. grandis* con fines de utilización en mejoramiento genético.
2. Identificar marcadores moleculares en *T. grandis* asociados a rasgos de importancia comercial y de alto control genético.
3. Analizar expresión génica de regiones del ADN de importancia económica en genotipos superiores de *T. grandis*.

4- Avances en la concreción de la metodología y su justificación

Se colectaron en el invernadero de la sede del ITCR de San Carlos (10°37'02"N 84°30'53"O) 45 genotipos élite de la colección de germoplasma de GENFORES . Cada genotipo fue colocado en sobres de papel con sílica gel y debidamente rotulado. Fueron transportados al laboratorio de Genética Molecular Forestal del ITCR en Cartago.

Se procedió a la extracción del ADN utilizando reactivos del kit comercial DNeasy Plant Mini (Qiagen®) y de la casa comercial Promega. El tejido (150 mg) fue macerado con nitrógeno líquido, se colocó en tubos de 2 ml y se siguieron las indicaciones de Qiagen® con las siguientes modificaciones: se utilizó dos veces el volumen de buffer AP1 y de ARNasa, esto porque el tejido se encontraba muy deshidratado por la sílica, por lo que al utilizar lo indicado por el fabricante no se obtuvo una cantidad suficiente de sobrenadante. La purificación del ADN genómico se realizó mediante columnas de filtrado marca DBio y buffer de lavado de la casa comercial Promega. Finalmente, la elución del ADN se realizó en un volumen final de 30 ul.

Las muestras fueron cuantificadas en un espectrofotómetro Nanodrop®

Las actividades anteriormente ejecutadas forman parte del OE 2.

El muestreo de 1 genotipo élite de teca y 1 genotipo inferior, la extracción del ADN de esos genotipos, la elaboración de las bibliotecas génicas y su respectiva secuenciación en la plataforma Illumina son actividades del OE 1 que ya fueron realizadas (reporte de BGI adjunto), queda pendiente iniciar el ensamblaje de las secuencias en el año 2019.

5- Avances en los resultados obtenidos a partir de la metodología planteada

La figura 1 y 2 muestran el ADN extraído y purificado. Los genotipos señalados con rojo (Figuras 1 y 2), son aquellos que requieren volverse a procesar, con el fin de aumentar su concentración de ADN y garantizar el éxito de las bibliotecas génicas.



Figura 1. Gel de agarosa al 2% para 24 genotipos de *T. grandis* pertenecientes a la colección de germoplasma de GENFORES.

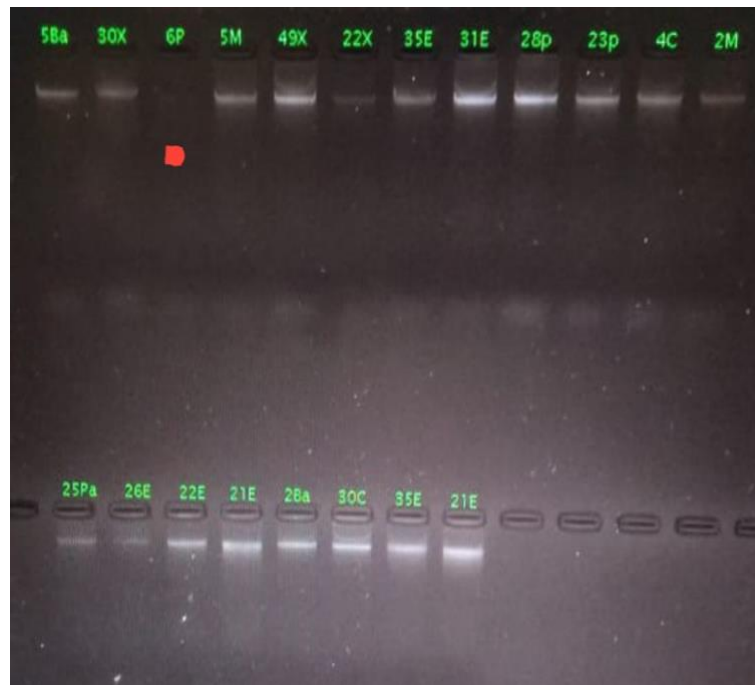


Figura 2. Gel de agarosa al 2% para 20 genotipos de *T. grandis* pertenecientes a la colección de germoplasma de GENFORES.

Los datos de concentración de ADN en ng/ul se muestran a continuación en el cuadro 1:

Cuadro 1. Concentración de ADN en ng/ul de 45 genotipos de la colección clonal GENFORES.

Genotipo	Concentración (ng/μl)
5BA	101,7
30X	176,3
6P	31,8
5M	92,2
49X	99,3
22X	37,1
35E	47,5

31E	8,9
28p	135,2
23p	83,6
4C	249,7
2M	110,8
25Pa	57,2
26E	153,4
22E	235,8
21E	155,8
2BA	2,3
30C	56
35E	122,22
21E	179
3M	120,5
53	105,5
1BA	137,4
3	70,5
11C	96,3
14C	111,7
36BA	50,4
37C	104,6
21Pa	103,6
20Pa	67,4
8X	219,7
33p	126,6
21BA	93,3

4	89,6
30	154,4
4M	130,2
1M	127,3
16Pa	152,4
2	95
4P	98
26Pa	172,1
Testigo	108,8
5X	173,2
32	74,2

6- Ajustes y dificultades encontradas en la realización del trabajo de investigación.

Durante todo este segundo semestre del 2018 he estado incapacitada debido a un tratamiento de quimioterapia que me mantiene con efectos adversos para laborar. Sin embargo, a través de mis compañeros de trabajo fue posible la colecta del material y mediante mis indicaciones, la asistente del laboratorio logró la extracción del ADN y su cuantificación.

Por lo tanto, se realizaron ajustes al cronograma con el fin de cumplir en los 2 años restantes los objetivos planteados.

7- Cronograma de trabajo para el cumplimiento de los objetivos propuestos.

		2019				2020			
Actividad		I	II	III	IV	I	II	III	IV
OE 1: Generar una secuencia del genoma de <i>T. grandis</i>	Análisis bioinformático y ensamblaje de las secuencias generadas por BGI con la plataforma Illumina.	X	X						
	Análisis genómico de un genotipo élite de teca y un genotipo del peor rendimiento, de acuerdo con su valor en el ranking genético.	X							
	Elaboración de bibliotecas génicas con genotipos de teca.		X	X					
	Secuenciación de las bibliotecas génicas en plataformas de nueva generación (PacBio).			X	X				
	Análisis bioinformático y ensamblaje de las regiones secuenciadas.				X	X			
OE 2: Identificar marcadores moleculares en <i>T. grandis</i> para mejoramiento genético.	Análisis genómico de un pool de 45 árboles élite de <i>T. grandis</i> , extracción y cuantificación del ADN.	Actividades ejecutadas							
	Elaboración de bibliotecas génicas con los genotipos élite.	X	X						

	Genotipado por secuenciación de las bibliotecas génicas.			X	X				
	Análisis bioinformático e identificación de marcadores moleculares (variantes con base en el genoma previamente obtenido).				X	X			
OE 3: Analizar niveles de expresión génica en genotipos superiores de <i>T. grandis</i> .	Análisis de relaciones entre la información fenotípica/genotípica de los ensayos de campo y, la información genómica de los rasgos de importancia económica.				X				
	Extracción de ARN y Retrotranscripción de ARN mensajero.				X				
	Elaboración de bibliotecas génicas (RNA-seq) de genotipos de teca.				X	X			
	Secuenciación de las bibliotecas génicas en plataformas de secuenciación de nueva generación.					X	X		
	Análisis bioinformático y construcción de perfiles de					X	X	X	

	expresión génica (transcriptoma).								
	Identificación de genes por análisis de similitud con base en el transcriptoma elaborado y genomas de referencia de <i>P. trichocarpa</i> y <i>A. thaliana</i> , para su anotación en las regiones de secuencia de interés en <i>T. grandis</i> .					X	X	X	
Redacción del documento final				X	X	X	X	X	
Revisión y correcciones									X
Pre-defensa de tesis									X
Revisión y correcciones finales									X
Defensa de tesis									X

8- Avances en publicaciones y divulgación del trabajo

Este semestre no se logró tener lista una publicación, sin embargo, fue aprobado en la VIE el proyecto de investigación que respalda el trabajo de doctorado, proyecto en el cual se incorpora el Dr. José Pablo Jiménez, asesor de tesis y quién trabajó en la Universidad de Carolina del Norte, USA en genómica de Almendro. Su apoyo y conocimientos adquiridos serán primordiales para el cumplimiento de objetivos.

Apéndice 2

The future is genomic: rapid clone selection for teak productivity and value

Andrew N. Callister

Treehouse Forest Research,

249 Level Bottom Road, Check, VA 24072 USA

Email: andrew@treehouse-research.com

Olman Murillo (**presenting author**)

Instituto Tecnológico de Costa Rica, School of Forest Engineering

Director GENFORES

Email: olmuga@yahoo.es

Jose Pablo Jiménez

Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, Instituto Tecnológico de Costa Rica.

Email: jpjimenez@itcr.ac.cr

Teak is integral to countless tropical landscapes, contributing to society as a high-value commercial timber crop and a key component of smallholders' livelihoods. Genetic improvement has great potential to increase the value of teak in such diverse systems, especially by deployment of well selected clones. Genomic prediction is now a well-tested technology for rapid evaluation of untested clones and revealing unknown relationships. Therefore, we aimed to develop genomic resources suitable for predictive modeling in teak. We demonstrate the approach using a small set of clones.

GENFORES is a Costa Rican based tree improvement cooperative with active breeding programs in 6 Latin American countries. This genomic project started in 2019 with cooperation of North Carolina State University. Thirty-three elite teak genotypes from 9 independent breeding programs were sequenced using a reduced representation approach. This resulted in 10,812 polymorphic SNP markers with MAF>0.05 and 93% realized accuracy. Of the genotyped clones, 26 were accompanied by their genetic ranking values from field tests of DBH, commercial volume, wood specific gravity, heartwood percentage, heartwood color, and stem quality (form). Genomic information revealed previously unknown relationships amongst 18 of the clones, consistent with 7 small full-sib families. Bayes ridge regression (BRR) was found to be superior to Bayes A, B, C, or Lasso prediction models.

Leave-one-out cross-validation of BRR models resulted in predictive ability of 0.66 for DBH, 0.60 for volume, 0.59 for specific gravity, and 0.40 each for heartwood percentage and stem quality. A genome-wide association study discovered 7 significant SNP markers for DBH, 8 each for Volume and Specific Gravity, 4 for Stem Quality, and 5 for Heartwood Color. These results compare favorably with published reports from other tree species. We conclude that genomic prediction for early clone selection in teak is a feasible and highly valuable approach.

Future work will focus on increasing the number of genotyped clones and test environments, and the functional annotation of significant markers. We expect that genomic evaluation will become standard in advanced teak improvement programs, particularly for pedigree reconstruction, rapid prediction for untested clones, and genetic connection of separate breeding populations.

TARGET SESSION: T2.29 Strengthening Teak Forest Management for Sustainable Teakwood Supply Chains and Trade.

Apéndice 3



Instituto Tecnológico de Costa Rica

Escuela de Biología

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo final de graduación

**ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE MEJORAMIENTO DE
Tectona Grandis L. MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES**

Laura Ramírez Arias

Cartago, 2020

ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE MEJORAMIENTO DE *Tectona Grandis* L. MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES

Laura Ramírez Arias

1.1

RESUMEN

Tectona grandis es una especie cuya madera es de calidad. Es muy utilizada para reforestación en Costa Rica y es importante avanzar en el mejoramiento genético para optimizar su producción. En esta investigación se analizó la estructura genética de las poblaciones de 3 empresas (BARCA, NovelTeak y PAW) pertenecientes a la cooperativa de mejoramiento genético forestal GENFORES. Se extrajo el ADN utilizando el protocolo de QIAGEN™. Se amplificaron 8 loci para BARCA, 10 loci para NovelTeak y 13 loci para PAW. Los productos de PCR se procesaron en el analizador de fragmentos QIAxcel y los datos fueron analizados con los software GenAlex y STRUCTURE. La población de mejoramiento de Panamerican Woods registró la menor diversidad genética ($N_e = 1,59$), mientras que la de Novelteak fue la de mayor diversidad ($N_e = 1,94$). La población BARCA se diferencia genéticamente de las otras dos poblaciones de mejoramiento Novelteak y PAW debido a un origen genético diferente. Las poblaciones PAW y Novelteak posiblemente comparten algunos ancestros comunes. Un 70% de la variación genética ocurre dentro de las poblaciones y el restante 30% se debe a las diferencias entre las tres poblaciones investigadas. Se recomienda aumentar la utilización del número de loci polimórficos a 13 para aumentar la sensibilidad de los análisis poblacionales. Las empresas deben focalizar esfuerzos de selección y cruzamiento dentro de su población de mejoramiento. Sin embargo, será beneficioso aumentar su base genética a través del intercambio de material genético entre sus programas de mejoramiento.

Palabras clave *Tectona grandis*, microsatélites, estructura genética, mejoramiento genético, genética de poblaciones

**ESTRUCTURA GENÉTICA EN POBLACIONES DE MEJORAMIENTO DE
TECTONA GRANDIS L. MEDIANTE MARCADORES MICROSATÉLITES**

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en biotecnología

Miembros del Tribunal

M.Sc. Fabiana Rojas Parajeles, Profesora tutora-ITCR.

Dr. José P. Jiménez Madrigal, Profesor tutor-ITCR.

Dr. Olman Murillo Gamboa, Profesor lector-ITCR.

DEDICATORIA

Al ángel que tengo en el cielo

*Y a quienes me quedan en la
tierra*

AGRADECIMIENTOS

A mi mamá, que ha estado pendiente de cada paso que he dado en la vida y no me ha soltado la mano jamás.

A mi papá, que aunque hoy ya no está, siempre se sintió orgulloso de mí y me impulsó a seguir adelante con mis sueños.

A mi hermana, mi apoyo incondicional en todo momento.

A Sebas, quien se encargó de recordarme siempre que debo creer en mí y no dejar de soñar.

A la MSc Fabiana Rojas, que ha sido guía para mí durante cuatro años y en todo este proceso y se ha encargado de que mi aprendizaje sea ameno.

Al Dr. José P. Jiménez por transmitirme un poco de su conocimiento y habilidades.

Al Dr. Olman Murillo, quien ha sido una parte fundamental de mi formación como ingeniera.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	2
DEDICATORIA	4
AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE GENERAL	6
ÍNDICE DE CUADROS	9
ÍNDICE DE FIGURAS.....	10
ÍNDICE DE ANEXOS.....	11
INTRODUCCIÓN.....	12
REVISIÓN DE LITERATURA.....	14
<i>Tectona grandis</i> (TECA)	14
GENFORES	17
MARCADORES MOLECULARES: MICROSATÉLITES	18
OBJETIVO GENERAL	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO	22
MATERIAL VEGETAL	22
EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES	23
AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES	25
ELECTROFORESIS CAPILAR	28
ANÁLISIS DE DATOS	28
RESULTADOS.....	30
ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL	30
1. Diversidad Genética	30

Población BARCA	30
Población Novelteak	32
Población PAW	33
2. Análisis de agrupamiento	35
Población BARCA	35
Población NovelTeak	36
Población PAW	37
ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL	38
1. Diversidad genética	38
2. Estructura Genética	40
Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y diferenciación genética	40
Agrupamiento según Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)	42
Agrupamiento según Análisis de Structure	43
DISCUSIÓN	45
ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL	45
1. Diversidad genética	45
Población BARCA	45
Población NovelTeak	47
Población PAW	48
2. Análisis de agrupamiento	48
Población BARCA	48
Población NovelTeak	49
Población PAW	49
ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL	49
1. Diversidad genética	49
2. Estructura genética	50
Análisis molecular de varianza (AMOVA) y diferenciación genética	50
Agrupamiento según análisis de coordenadas principales (PCoA)	52
Agrupamiento según análisis de Structure	52
CONCLUSIONES	53

RECOMENDACIONES	53
BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXOS	56

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1. SECUENCIA DE IMPRIMADORES REPORTADOS POR EL CIRAD Y EN EL GENBANK PARA TECA. F (IMPRIMADOR HACIA ADELANTE) Y R (IMPRIMADOR REVERSO).	22
CUADRO 2. RECETA PARA PCR UTILIZADA PARA LA AMPLIFICACIÓN DE LOS MICROSATÉLITES	23
CUADRO 3. PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA POBLACIÓN DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TECA (TECTONA GRANDIS) DE LA EMPRESA BARCA (N = 26), PARRITA, PACÍFICO CENTRAL DE COSTA RICA	26
CUADRO 4. PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA POBLACIÓN DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TECA (TECTONA GRANDIS) DE LA EMPRESA NOVELTEAK (N = 48), GUANACASTE COSTA RICA	28
CUADRO 5. PARÁMETROS GENÉTICOS DE LA POBLACIÓN DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TECA (TECTONA GRANDIS) DE LA EMPRESA PANAMERICAN WOODS (N = 50), NANDAYURE, GUANACASTE COSTA RICA	29
CUADRO 6. PARÁMETROS GENÉTICOS DE LAS POBLACIONES DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TECA (TECTONA GRANDIS) DE LAS EMPRESAS BARCA, NOVELTEAK Y PAW (N = 124), COSTA RICA	33
CUADRO 7. DISTANCIA GENÉTICA DE NEI PARA TRES POBLACIONES DE TECA PERTENECIENTES A LAS EMPRESAS BARCA, NOVELTEAK Y PAW.	34
CUADRO 8. COEFICIENTE DE DIFERENCIACIÓN GENÉTICA (FST) PARA TRES POBLACIONES DE TECA PERTENECIENTES A LAS EMPRESAS BARCA, NOVELTEAK Y PAW.	35

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de las colectas de material vegetal de <i>Tectona Grandis</i> de las empresas BARCA, Novelteak y PAW en Costa Rica. Elaborada con QGIS Desktop 3.4.15 por Casia Soto Montoya.....	23
Figura 2. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa BARCA (N=26, 8 loci microsatélites), Parrita, Pacífico central de Costa Rica.....	36
Figura 3. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa Novelteak (N=48, 10 loci microsatélites), Guanacaste, Costa Rica.	37
Figura 4. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa PAW (n=50, 13 loci microsatélites), Guanacaste, Costa Rica.	38
Figura 5. Comparación entre genotipos que coinciden y genotipos únicos incrementando combinaciones de 8 loci. Donde el eje x representa la combinación de loci amplificados, el eje y la cantidad de genotipos, la línea azul los genotipos que coinciden y la línea naranja los genotipos únicos.	40
Figura 6. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en las poblaciones de mejoramiento genético de teca de las empresas BARCA, Novelteak y PAW (13 loci microsatélites), Guanacaste, Costa Rica.	43
Figura 7. Determinación del valor ΔK más probable que define el número de poblaciones genéticamente diferentes, en el programa de mejoramiento genético de teca de GENFORES en Costa Rica, con base en el programa Structure Harvest.44	
Figura 8. Diagrama de barras sobre la probabilidad de agrupamiento poblacional (K), calculada con el programa STRUCTURE, para los individuos de las tres poblaciones de mejoramiento genético de teca en GENFORES, Costa Rica.	45

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. DISTRIBUCIÓN DE LA VARIANZA GENÉTICA MOLECULAR ENTRE Y DENTRO DE TRES POBLACIONES DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE TECA EN COSTA RICA (N=124).55

INTRODUCCIÓN

Tectona grandis (Teca) es una especie forestal originaria de Birmania, Tailandia y ciertas regiones de la India. El primer país de América en el que se introdujo fue Trinidad y Tobago hace aproximadamente 100 años (Arguedas *et al.* 2015). Se ha establecido con éxito en Bangladesh, China, Nigeria, Costa de Marfil, Puerto Rico, y algunos países de América como Panamá, Brasil, Ecuador, Colombia, Nicaragua y Costa Rica. El objetivo principal de cultivar teca es producir árboles maderables con buen crecimiento y de gran calidad (FAO 2013).

En Centroamérica la teca se caracteriza por iniciar su floración entre los cinco y ocho años, a partir de ese momento comienza a producir semilla fértil. Sin embargo, esa semilla generalmente requiere de tratamientos para contrarrestar el estado de latencia en el que se encuentra (Prado 2012). El árbol de teca es caducifolio, de tamaño grande, y puede llegar a los 45m de altura en condiciones naturales, por ejemplo, en el Sudeste de Asia (Schargel y Hernando 2008).

Las flores de teca son hermafroditas y son polinizadas principalmente por insectos. En esta especie predomina la polinización cruzada y se ha demostrado que existen bajos niveles de éxito cuando se da la autopolinización (Minn *et al.* 2014).

En cuanto a su madera, la FAO (2013) afirma que la teca es una de las maderas más conocidas del mundo. Sus principales atractivos son su color, durabilidad, facilidad de trabajo, el secado sin agrietamiento, y su resistencia a termitas, hongos y a la intemperie. Además, Nieto *et al.* (2014) afirman que la importancia de la teca radica en que su madera es de alta calidad y aporta gran cantidad de biomasa al suelo. Adicionalmente, es apreciada por su dureza, no se oxida, ni se corroe al contacto con metales. Según Anish *et al.* (2015), el alto valor de la teca como madera se debe a sus propiedades mecánicas y físicas superiores a otras especies, además de que tiene una agradable apariencia.

Debido a su importancia comercial, los patrones de variación genética en teca han sido investigados haciendo uso de diferentes marcadores genéticos, tales como

isoenzimas (Kertadikara y Prat 1995), polimorfismos de amplificación aleatoria del ADN (RAPDs por sus siglas en inglés) (Aborisade y Aweto 1990), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs por sus siglas en inglés) (Vaishnav *et al.* 2015), y microsatélites (Fofana *et al.* 2009; Rojas 2014). Se ha logrado demostrar que para esta especie, en poblaciones naturales, las variaciones genéticas se dan principalmente entre poblaciones y no dentro de individuos de una misma población (Varghese *et al.* 2003 y Shrestha *et al.* 2005).

Según Mollinedo *et al.* (2016) y Barrantes y Ugalde (2015), en Costa Rica, a partir del 2010 hubo un aumento en las exportaciones de teca, que han estimulado la incorporación de mayor tecnología para aumentar su productividad y disminuir costos de manejo.

Por otra parte, en nuestro país la teca ha sido una de las especies más utilizadas para reforestación, por lo que es de suma importancia avanzar en el campo del mejoramiento genético. Además, la utilización de clones es fundamental en la silvicultura moderna, ya que disminuye la variabilidad de la plantación y provoca el aumento de su productividad; adicionalmente, en los ensayos clonales se seleccionan los individuos con un crecimiento superior, que posteriormente son utilizados en los programas de mejoramiento genético (Molina 2017).

Los marcadores moleculares pueden ayudar de forma significativa en los programas de mejoramiento genético forestal. Algunas de las aplicaciones de estas herramientas son la verificación de identidad genética, evaluación de la relación genética entre clones dentro de una población, selección temprana, así como cuantificación de la variabilidad genética de la población de mejoramiento genético (González 2007). Entre las técnicas más destacables para el estudio de la diversidad vegetal y forestal se encuentran los RAPD, AFLP y los microsatélites. En los últimos años, los microsatélites han cobrado importancia debido a su nivel de polimorfismo, su carácter codominante, facilidad de aplicación y alta reproducibilidad. Además del estudio de poblaciones con ese tipo de marcadores, los microsatélites son útiles para identificar duplicados en bancos de germoplasma y para establecer grupos o asociaciones entre individuos. Los análisis estadísticos

que se aplican a los resultados obtenidos permiten determinar frecuencias alélicas, nivel de polimorfismo, diversidad genética, distancia genética y agrupamiento, para así determinar la estructura genética de poblaciones (Rugeles 2011).

Según Fuentes, Legaria y Ramírez (2019), establecer la estructura genética de una población es de suma importancia para poder proponer tanto estrategias de conservación como programas de manejo sostenible y sustentable del material a largo plazo, esto especialmente para poblaciones naturales. Sin embargo, para poblaciones mejoradas, la estructura genética es una herramienta que permite conocer la procedencia de las poblaciones y su emparentamiento, para la toma de decisiones y poder continuar con el proceso de mejoramiento genético (Myles *et al.* 2011).

En el año 2002 en Costa Rica se creó la cooperativa de mejoramiento y conservación genética, llamada GENFORES, que vincula la academia con la empresa. Eso se logró mediante la participación de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR) y más de 10 empresas nacionales e internacionales. Su objetivo principal es la conservación y desarrollo de recursos genéticos forestales para ofrecer material con la más alta calidad genética a la reforestación comercial (Molina *et al.* 2019).

Con esta investigación, se busca analizar poblaciones de tres empresas miembro de la cooperativa y así establecer su estructura genética. Los resultados obtenidos con este análisis permitirán tomar decisiones para continuar con el proceso de selección de genotipos élite de teca, así como avanzar a las siguientes generaciones de mejoramiento.

REVISIÓN DE LITERATURA

***Tectona grandis* (TECA)**

La teca es una especie latifoliada perteneciente a la familia Lamiaceae. Este árbol se caracteriza por llegar a medir hasta 50 m de altura y tener un diámetro de incluso 2 m en su lugar de origen, sin embargo, en Costa Rica su altura máxima ronda los 35 m (Camacho *et al.* 2013).

La madera de teca es considerada dentro de las más valiosas debido a su agradable apariencia y colores distintivos. Además, se destacan sus propiedades de estabilidad que la hacen única e ideal para exteriores (Gutiérrez *et al.* 2008).

Según un boletín técnico del CATIE (2013) la madera de teca tiene una gran demanda desde hace mucho tiempo gracias a su calidad. A pesar de que otras especies de árboles para madera tienen buen mercado, estas cuentan con dificultades a la hora de ser cultivadas en plantación. Dentro de estas maderas de alto valor se encuentran por ejemplo las caobas, pero son atacadas por insectos y así se reduce su productividad en cultivo. Se encuentra también cocobolo, que no posee altas tasas de crecimiento. Esto provoca que los intentos por cultivarlas sean inviables producto de problemas fitosanitarios y bajo rendimiento en su cultivo en plantación.

Esta situación coloca a la teca como la madera tropical de calidad más cultivada del mundo. Sus mejores cualidades para cultivo comprenden su mínima amenaza de erosión, su fácil propagación y que no es una especie invasora a pesar de cultivarse como especie exótica. Por otra parte, las cualidades de su madera que más se destacan son que es una madera fuerte, liviana, con estabilidad, resistente a las termitas y a los productos químicos, hongos e intemperie, además de que es muy duradera (CATIE 2013).

Por su alta calidad y creciente mercado, se ha trabajado mucho con teca y la estructura genética de diferentes poblaciones. Dentro de los trabajos más destacables se encuentra el de Hansen *et al.* (2015), en el cual genotiparon 29 procedencias de teca que representaban el rango de distribución natural de la especie, utilizando microsatélites. Para esto, tomaron individuos de 7 regiones diferentes y después de aplicar análisis estadísticos encontraron una fuerte

diferencia en la diversidad genética de las regiones evaluadas. Lograron determinar el área con mayor y menor diversidad genética, lo que sirvió como base para programas de conservación de teca. Ese tipo de información podría ser de ayuda si en el futuro se desea empezar un programa de mejoramiento genético.

Otro estudio realizado en Birmania en 2014 por Prinz y Finkedey. buscaban caracterizar los patrones de variación genética en poblaciones naturales de teca y evaluar el impacto de la explotación forestal para esta especie. Para esto tomaron 16 poblaciones, cada población consistió en 50 adultos y 50 semillas de regeneración natural, y las evaluaron utilizando 10 microsatélites. Los resultados arrojaron que existía una gran diferencia entre las poblaciones del norte y las del sur; sin embargo, la diferencia entre adultos y semillas y entre poblaciones explotadas y no explotadas no era significativa. A pesar de no haber logrado comprobar que existía un efecto en la explotación forestal de teca, ni en la regeneración, los resultados sugieren que es importante incluir individuos de poblaciones del norte y del sur en programas de conservación o mejoramiento para obtener la mayor diversidad genética.

En India se estudió la estructura genética dentro y entre poblaciones de nueve poblaciones naturales utilizando marcadores moleculares del tipo polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés). Con este estudio se logró establecer una correlación entre la distancia genética y geográfica, además de que cada población posee una identidad específica que la diferencia de las demás (Sreekanth *et al.* 2012).

En Costa de Marfil, en aras de preservar los recursos genéticos de la teca y garantizar el suministro de germoplasma de alta calidad genética para el mejoramiento de poblaciones, se realizó un estudio en el que se utilizaron microsatélites para investigar el nivel de variación genética de la teca de este país. A partir de esto se determinó que la variación entre procedencias es del 80%, entre poblaciones de 5,5% de una misma región y 13,98% entre poblaciones de regiones diferentes. Además, se concluyó que las poblaciones locales provienen de India y Tailandia (Fofana *et al.* 2008).

GENFORES

Según Murillo, Badilla y Rojas (2010), en 1998 surge en Costa Rica un programa cuyo objetivo era producir plantas mejoradas para la reforestación. La idea era establecer un vínculo entre el ITCR y empresas reforestadoras del país. Sin embargo, para cumplir con el fin de esta cooperativa, cuyo nombre es GENFORES, se tuvo que seguir un proceso con varias etapas. Primero, se dio la etapa de incubación de conocimiento, que se llevó a cabo por más de dos años. Para esta etapa se contó con el apoyo de la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del Instituto Tecnológico de Costa Rica y de la Fundación para el Desarrollo de la Cordillera Volcánica Central (FUNDECOR). La siguiente etapa fue la que dio origen al vínculo con las empresas, para esto se pasó por una escala experimental en la cual se construyó el primer invernadero en el Campus Tecnológico Local San Carlos ITCR. En este punto se logró avanzar en una nueva tecnología de clonación de árboles a una escala semi-comercial.

Como parte de este vínculo entre la escuela de Ingeniería Forestal del ITCR y las empresas se ha desarrollado una importante cantidad de actividades de capacitación, asesoría y transferencia de conocimiento. Adicionalmente, ha logrado brindar diferentes servicios, como impartir cursos de mejoramiento genético de forma continua. Otro de los servicios destacables es la creación de un laboratorio de genética molecular utilizado para controlar la pureza clonal de las colecciones, además de servir de apoyo para los procesos de mejoramiento genético. Estos eventos, junto con la unión de nuevas empresas, permitió alcanzar niveles comerciales; e incluso contar con empresas internacionales en el año 2006 (Murillo *et al.* 2010).

Actualmente la cooperativa busca mejorar la productividad y calidad de las plantaciones, disminuir costos de investigación, capacitación, adecuación y transferencia de tecnología en el campo de la reforestación y mejorar las condiciones para la inversión en el sector forestal (Murillo *et al.* 2010).

MARCADORES MOLECULARES: MICROSATÉLITES

Los marcadores moleculares son secuencias específicas de ADN localizadas en determinadas ubicaciones del genoma que tienen como características principales que no se ven afectados por el ambiente y que tienen herencia mendeliana (Alcántara 2007). Además, los marcadores moleculares son fenotípicamente neutros y presentan mayor polimorfismo que los marcadores morfológicos (Azofeifa 2006).

Durante las últimas décadas el uso de marcadores moleculares ha ido en crecimiento hasta llegar a cumplir un papel muy importante en el estudio genético de plantas (Kumar *et al.* 2009). Algunas ventajas que presentan estas nuevas técnicas sobre otras son su facilidad de uso, estabilidad y rentabilidad. Dentro de las aplicaciones que tienen están el mapeo genómico, análisis filogenético y medición de diversidad genética. Las técnicas que más se han utilizado en el mundo son polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP por sus siglas en inglés), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD por sus siglas en inglés), polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), secuencias intergénicas repetidas simples (ISSR por sus siglas en inglés), pequeña secuencia repetida en tándem (SSR por sus siglas en inglés), también conocidos como microsatélites y polimorfismos de nucleótido único (SNP por sus siglas en inglés) (Grover *et al.* 2016).

A pesar de que hay diferentes tipos de marcadores moleculares y de que la elección depende del caso específico, los microsatélites han sido los más comunes debido a su facilidad de aplicación mediante PCR y a que usualmente se obtienen muchos alelos por locus (Kumar *et al.* 2009).

Los microsatélites consisten en repeticiones en tándem de entre 2 y 7 pares de bases en arreglos de mono-, di-, tri-, tetra- y penta nucleótidos con diferente número de repeticiones. Es justamente el número de repeticiones lo que define los

diferentes alelos para un locus y el grado de polimorfismo (Jonah *et al.* 2011). Los microsatélites se encuentran distribuidos a lo largo del genoma eucariota, especialmente en regiones no codificantes y tienen la particularidad de poder reconocer los alelos heredados por ambos progenitores, por lo que permiten distinguir entre dos individuos con gran exactitud (Aranguren 2005). Además de ser marcadores moleculares con una alta reproducibilidad, se han utilizado en investigaciones con varias especies vegetales y forestales (Jonah *et al.* 2011).

En Bolivia, que posee una gran diversidad de *Solanum tuberosum* (papa) por ser parte del centro de origen de este cultivo, se realizó un estudio para conocer y explotar con más eficiencia dicha diversidad. Para esto se utilizaron 22 marcadores moleculares microsatélite en seis especies de papa cultivada. Lograron determinar que la diversidad genética depende de la especie y de esta forma encontraron las especies más y menos diversas, lo que permite hacer un mejor uso del material disponible. Además, lograron reconocer que algunas accesiones que se creían diferentes son potencialmente duplicados (Cadima *et al.* 2013).

En Oaxaca se usó este tipo de marcador molecular para evaluar el efecto del manejo forestal en la diversidad genética en *Pinus patula* (pino), debido a que es la especie forestal más importante de la zona. Para llevar a cabo el estudio se usaron 3 microsatélites para seis sitios diferentes, tres con manejo forestal y tres con regeneración natural. Al finalizar, encontraron que no hay efecto negativo del manejo forestal en la diversidad genética de esta especie, ya que la gran cantidad de individuos contrarresta la pérdida de alelos. Sin embargo, es importante tomar en cuenta los resultados si se desea proceder con selección de árboles superiores y mejoramiento genético, ya que una selección inadecuada podría llevar a una pérdida de diversidad considerable (Alfonso *et al.* 2014).

En *Eucalyptus globulus* (Eucalipto), que es una de las especies forestales más cultivadas a nivel mundial, se hizo un estudio de poblaciones en mejoramiento de Colombia usando microsatélites. Para esto se evaluó un huerto semillero de diferentes procedencias y se utilizaron 13 microsatélites. No se encontraron valores

muy altos de similitud genética, sin embargo, se recomienda la introducción de genotipos para aumentar la diversidad genética (Sánchez 2013).

En Costa Rica también se han utilizado microsatélites para estudiar poblaciones forestales. Rojas *et al.* (2012) evaluaron 33 accesiones de una colección de 62 individuos de *Vochysia guatemalensis* procedentes de poblaciones naturales y plantaciones utilizando 4 microsatélites para determinar su huella genética. Los resultados obtenidos pueden ser utilizados como base para procesos de certificación genética o programas de mejoramiento genético.

Además, una de las aplicaciones más importantes de los marcadores moleculares, y de los microsatélites en particular, es la determinación de la estructura genética de poblaciones. Esto es posible debido a que los marcadores moleculares permiten obtener gran cantidad de información genómica (frecuencias alélicas, distancias genéticas, etc.), que puede ser procesada para identificar la estructura genética de un conjunto de individuos.

Conocer la estructura genética permite tomar decisiones más informadas en programas de conservación o de mejoramiento genético. En cuanto a los programas de conservación, se deben incluir recursos representativos y los únicos y singulares, los cuales se identifican gracias al estudio de estructura genética de las poblaciones (Jiménez y Collada 2000). En cuanto al mejoramiento genético, este tiene como objetivo concentrar genes o combinaciones de genes favorables, por lo que es indispensable conocer la estructura genética para saber con qué material se cuenta y qué cruces hacer (Rimieri 2017).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la estructura genética y grado de parentesco dentro y entre poblaciones de mejoramiento genético de *Tectona grandis* en Costa Rica.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Genotipar mediante microsatélites la colección de clones de tres poblaciones de teca de empresas miembro de GENFORES
- 2) Analizar la estructura poblacional y el grado de parentesco de tres poblaciones de mejoramiento de teca.

MATERIALES Y MÉTODOS

LOCALIZACIÓN DEL ESTUDIO

La presente investigación se desarrolló en el Laboratorio de Genética Molecular Forestal del Centro de Investigación en Innovación Forestal (CIF) de la Escuela de Ingeniería Forestal del Instituto Tecnológico de Costa Rica (ITCR), Campus Tecnológico Central Cartago, Costa Rica.

MATERIAL VEGETAL

El material colectado pertenece a tres poblaciones de teca de tres empresas miembro de GENFORES: BARCA, Panamerican Woods (PAW) y NovelTeak.

La recolección se hizo en las siguientes localidades: En Coyote de Nandayure y Puerto Carrillo de Hojanca para la empresa PAW; Playa Garza de Nicoya y Peñas Blancas para la empresa NovelTeak; y en Parrita para la empresa BARCA. Las colecciones genéticas se localizan en minijardines clonales en los invernaderos de las tres empresas investigadas.

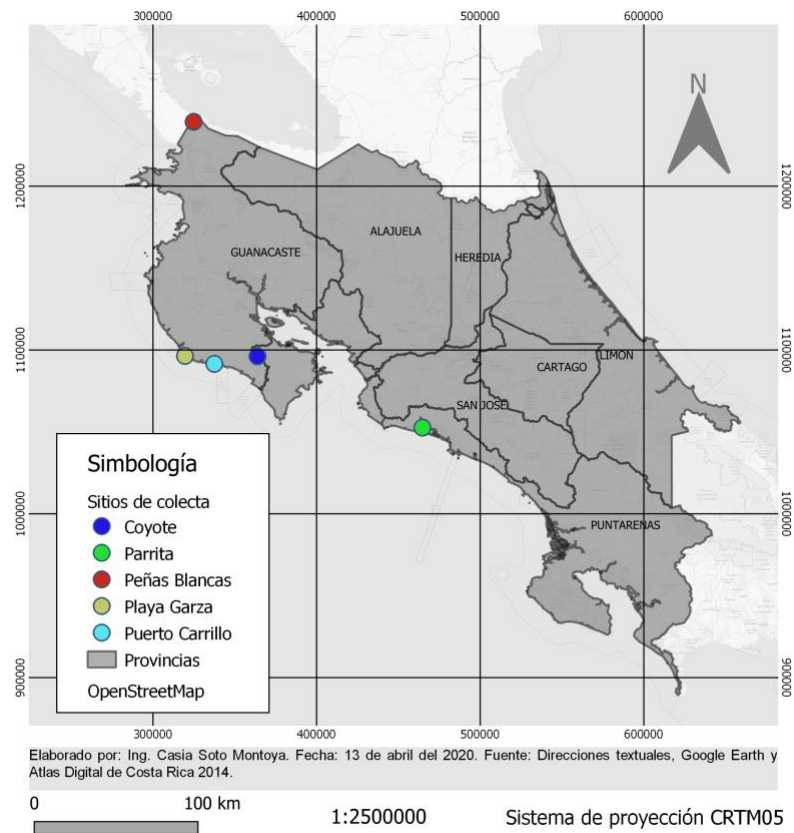


Figura 1. Ubicación de las colectas de material vegetal de *Tectona Grandis* de las empresas BARCA, Novelteak y PAW en Costa Rica. Elaborada con QGIS Desktop 3.4.15 por Casia Soto Montoya.

De cada accesión se colectó al menos tres brotes de tejido foliar fresco se colocaron en sobres de papel con sílica gel para deshidratar el material. Posteriormente se transportó al Laboratorio de Genética Molecular Forestal del CIF de la sede central del TEC para su procesamiento.

EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS TOTALES

Para la extracción de ácidos nucleicos totales, se colocó 100 mg de tejido deshidratado en tubos de 2 ml con tapa de rosca y se maceró en el Fast Prep® de la casa comercial MP Biomedicals. Posteriormente se siguió el protocolo establecido en el DNeasy Plant Mini Kit de la casa comercial QIAGEN™ (2016) con

las siguientes modificaciones: una vez que el tejido fue macerado, se le agregó 800 μ l del amortiguador AP1 y 8 μ l de ARNasa, se mezclaron los componentes en Vortex durante 15 segundos. Los tubos se incubaron a 65 °C durante 10 minutos y durante este tiempo se mezclaron por inversión tres veces. Terminada la incubación, se agregó 130 μ l del amortiguador P3, se mezcló por inversión 20 veces y se incubó en hielo durante 5 minutos. Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga modelo 5424 de la casa comercial Eppendorf. Posteriormente se tomaron aproximadamente 600 μ l del sobrenadante y se transfirieron a una columna de retención de ADN de la casa comercial Omega Bio-Tek®. Las columnas se centrifugaron a 14000 rpm durante 2 minutos, se descartó el líquido remanente y se adicionaron 500 μ l del amortiguador AW1 a la columna. Se centrifugaron las columnas a 800 rpm durante 1 minuto y se transfirió la columna a un tubo Eppendorf de 2 ml nuevo. Se repitió el mismo proceso dos veces más, pero esta vez utilizando etanol 70% v/v frío en lugar de amortiguador AW1. Posteriormente se colocaron las columnas en tubos Eppendorf de 1,5 ml limpios y se dejaron abiertas durante 1 minuto. Por último, se agregaron 20 μ l del amortiguador de elución AE y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugó a 800 rpm durante 1 minuto y se repitió este paso una vez más. El ADN resultante fue almacenado a -20 °C.

Para verificar la calidad del ADN extraído, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 2% m/v con amortiguador TAE 1X y con 1 μ l de Gel Red por cada 100 ml de amortiguador TAE 1X. La electroforesis se corrió durante 30 minutos a 100 Voltios constantes en una cámara de electroforesis ENDURO™ Gel XL (Labnet International, Inc). Se cargó 3 μ l de amortiguador de carga y 5 μ l de ADN. Para la visualización se utilizó el foto documentador Molecular Imager® Gel Doc™ XR+ de la casa comercial BIO-RAD y el programa Quantity One 1-D Analysis v. 4.6.8. Además, se evaluó la concentración de ADN con un espectrofotómetro Nanodrop de la casa comercial Thermo™.

AMPLIFICACIÓN DE MICROSATÉLITES

Las muestras de ADN previamente extraídas se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) con imprimadores reportados por el Centro de cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo (CIRAD por sus siglas en francés) (Verhaegen *et al.* 2005) y con imprimadores depositados en el GenBank (Volkaert, datos no publicados). Sus secuencias se detallan en el cuadro 1.

Para la población de la empresa BARCA se amplificaron 8 loci (B02, AC44, B07, C03, A06, A11, AC01, AG14 y Da12); para la población de NovelTeak se amplificaron 10 loci (B02, AC44, B07, C03, A06, A11, AC01, AG14, Da12 Y F01) y la población de la empresa PAW se amplificaron 13 loci (B02, AC44, B07, C03, A06, A11, AC01, AG14, Da12, F01, G02, H09 y F02).

Cuadro 1. Secuencia de imprimadores reportados por el CIRAD y en el GenBank para teca. F (imprimador hacia adelante) y R (imprimador reverso).

Locus	Secuencia	
A06	F	5'-CAAAACAAAACCAATAGCCAGAC-3'
	R	5'-TTTCATCATCATCAACATCC-3'
B07	F	5'-GGGTGCTGATGATTTTGAGTT-3'
	R	5'-CTAAGGAGTGAGTGGAGTTTT-3'
C03	F	5'-AGGTGGGATGTGGTTAGAAGC-3'

	R	5'-AAATGGTCATCAGTGTTCAGAA-3'
A11	F	5'-AAACCATGACAGAAACGAATC-3'
	R	5'-TTGGGAATGGGAGGAGAAGT-3'
B02	F	5'-ATGAAGACAAGCCTGGTAGCC-3'
	R	5'-GGAAGACTGGGGAATAACACG-3'
F01	F	5'-GCTCTCCACCAACCTAAACAA-3'
	R	5'-AAAACGTCTCACCTTCTCACT-3'
Da12	F	5'-CGCACACCAGTAGCAGTAGCC-3'
	R	5'-GCCGGAAAAAGAAAAACCAAA-3'
H09	F	5'-GCAAACCAACCTTACT- '3
	R	5'-CCGTTAGCACTCCATT- '3
G02	F	5'- TTAACGCCAAATCCCAAAG- '3
	R	5'-CACAAAGAGAACCGACGAG- '3
F02	F	5'-CCGGTAAAAAGGTGTGTCA-3'
	R	5'-GAGTGGAAGTGCTAATGGA-3'

AC44	F	5'-ACGCGGGTGTTAGGAAAATG-3'
	R	5'-CCCATCAAACCTGAGACAACCA-3'
AC01	F	5'-CATGTTGTATCATGAATGTG-3'
	R	5'-CCTAGAAGAGAACCCCATGC-3'
AG14	F	5'-TCCACGACTCATGCAGGCTA-3'
	R	5'-CCAACCAACCCTTTCAAATCC-3'

Para cada reacción se utilizó la polimerasa GoTaq, de la casa comercial Promega. Los componentes y proporciones de la reacción se describen en el cuadro 2.

Cuadro 2. Reactivos utilizados en la PCR para la amplificación de los microsatélites.

Reactivo	Cantidad por reacción (ul)
amortiguador de PCR 5X	4
MgCl ₂ mM	1,6
dnTP's 2,5mM	1,6
Forward 5uM	0,8
Reverse 5uM	0,8
ADN	1

Taq 5U/ul	0,2
H ₂ O	10
Volumen final	20

1.1.1

ELECTROFORESIS CAPILAR

Los productos de PCR fueron colocados en el analizador de fragmentos QIAxcel de la casa comercial QIAGEN, donde se obtuvo el tamaño de los alelos de cada individuo. Se construyó una base de datos para cada población con base en el trabajo previo de validación de alelos realizado por Rojas *et al.* (datos sin publicar).

ANÁLISIS DE DATOS

Los datos de la salida del QIAxcel fueron registrados y categorizados en alelos según su tamaño molecular, utilizando como base el cuadro de interpretación de los alelos para los microsatélites utilizados en teca (Rojas *et al.*, datos no publicados).

Se utilizó el software GenAlEx versión 6.503 (Peakall y Smouse 2012) para el análisis de la diversidad genética poblacional mediante el cálculo de las frecuencias alélicas, determinadas para cada locus; mediante la comparación de la heterocigosidad observada y esperada, calculadas por conteo directo de alelos; y calculando el índice de fijación (F), que permite saber la distribución de los genotipos dentro de las poblaciones; y el índice de Shannon, que permite separar la variación genética entre y dentro de poblaciones. Además, se calculó la distancia genética utilizando los estadísticos de distancia genética de Nei, el cual es uno de los más utilizados para calcular distancia entre poblaciones y básicamente lo que pretende es estimar el número de mutaciones que se han acumulado a nivel de nucleótidos, en la secuencias de dos poblaciones desde su divergencia original; el coeficiente de diferenciación genética (F_{st}), que mide la reducción de la heterocigosidad debida

a diferenciación genética entre poblaciones y se realizó un análisis de coordenadas principales, que permite visualizar de forma gráfica la distancia genética entre individuos. Este procedimiento se realizó para cada una de las poblaciones y para todas las poblaciones juntas. Además, para todas las poblaciones se calculó la varianza intra e inter poblacional mediante un Análisis Molecular de Varianza (AMOVA), que permite estimar la diferenciación genética a varios jerárquicos (entre y dentro de poblaciones).

Se utilizó también el programa de agrupamiento bayesiano STRUCTURE v.2.3.4. (Pritchard *et al.* 2000) para verificar el grado de estructura poblacional mediante un modelo mixto con frecuencias alélicas correlacionadas, considerando 100 iteraciones por cada K, para un total de 10 K. El valor de ΔK (Evanno, Regnaut y Goudet 2005) se procesó con el programa Structure Harvester (Earl y vonHoldt 2012).

RESULTADOS

ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL

1.1. Diversidad Genética

1.1.1 Población BARCA

Los análisis estadísticos para la población de 26 individuos perteneciente a la empresa BARCA, se llevaron a cabo utilizando ocho loci polimórficos diferentes (B02, AC44, B07, C03, A06, A11 AC01 y AG14). Sin embargo, hay que tomar en cuenta que hay 7% de datos faltantes para el locus AC01. En esta población se encontró que el número de alelos diferentes (N_a), en promedio, es de 3 y los alelos efectivos (N_e) es de 1,85 (Cuadro 3), donde los loci B02, AC01 y AG14 presentaron el mayor número de alelos diferentes siendo este $N_a = 4$, además esos loci reportaron valores de 2,36; 2,25 y 2,33 de alelos efectivos respectivamente. Mientras que en los loci B07 y A11 se obtuvieron solamente 2 alelos diferentes (la menor cantidad), con 1,04 y 1,95 de alelos efectivos respectivamente.

El valor de heterocigosidad esperada (H_e) más bajo fue de 0,04 para el locus B07, hasta 0,58 para el locus B02. Con un promedio en la población de 0,41 (Cuadro 3). Mientras que la heterocigosidad observada (H_o) promedio fue de 0,46; con un rango de 0,04 hasta 0,92 en los loci B07 y C03 respectivamente.

Con respecto al índice de Shannon, se obtuvo un promedio de 0,69 para la población, con valores desde 0,10 hasta 1,08 en los loci B07 y AG14 respectivamente.

El índice de fijación (F) promedio está por debajo de 0 con un valor de -0,149; con 6 de los 8 loci con valores negativos (B02, B07, C03, A06, A11 y AG14), donde solamente AC44 y AC01 registraron valores positivos.

Cuadro 3. Parámetros genéticos de la población de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis*) de la empresa BARCA (N = 26), Parrita, Pacífico central de Costa Rica

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
B02	25	4	2,36	1,02	0,84	0,58	0,59	- 0,46
AC44	26	3	1,22	0,38	0,12	0,18	0,18	0,35
B07	25	2	1,04	0,10	0,04	0,04	0,04	- 0,02
C03	25	3	2,16	0,83	0,92	0,54	0,55	- 0,71
A06	25	2	1,47	0,50	0,40	0,32	0,33	- 0,25
A11	26	2	1,95	0,68	0,85	0,49	0,50	- 0,73
AC01	24	4	2,25	0,97	0,12	0,56	0,57	0,77
AG14	26	4	2,33	1,08	0,65	0,57	0,58	- 0,15
Promedio	25,25	3	1,85	0,69	0,49	0,41	0,42	- 0,15

Donde, N: Número de individuos de la población, Na: Número de alelos diferentes, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, uHe: Heterocigosidad esperada imparcial, F: índice de fijación.

1.1.2 Población Novelteak

Para la población de mejoramiento genético de la empresa Novelteak (N= 48) los análisis de diversidad genética se realizaron tomando en cuenta 10 loci polimórficos (B02, AC44, B07, C03, A06, A11, AC01, AG14, Da12 y F01). Es importante indicar que en los loci AG14 y Da12 hay 8% de datos faltantes. El Na promedio para esta población fue de 3,10. Los loci B02, F01 y AC44; reportaron valores por encima del promedio (B02 y F01 con 4 y AC44 con 5). Mientras que el promedio de Ne fue de 1,94. Donde el locus AC44 registró el mayor valor con 1,40 y AC01 el locus con el menor número de alelos efectivos con 1,28. (Cuadro 4). El valor de He promedio fue de 0,45, un valor más alto que el determinado para Ho con 0,06. En todos los loci la Ho fue más baja que la esperada, llegando incluso a valores de 0 en los loci A11, AC01 y Da12. El índice de Shannon promedio fue de 0,78 y el índice de fijación promedio fue de 0,86.

Cuadro 4. Parámetros genéticos de la población de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis*) de la empresa Novelteak (N = 48), Guanacaste Costa Rica

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
B02	47	4	2,24	0,10	0,04	0,55	0,56	0,92
AC44	48	5	3,41	1,40	0,02	0,71	0,71	0,92
B07	48	3	1,47	0,61	0,04	0,32	0,32	0,87

C03	48	3	1,94	0,74	0,12	0,48	0,49	0,74
A06	48	2	2,01	0,84	0,17	0,50	0,51	0,67
A11	47	2	1,86	0,65	0	0,46	0,47	1
AC01	48	2	1,28	0,38	0	0,22	0,22	1
AG14	44	3	1,46	0,59	0,16	0,31	0,32	0,49
Da12	44	2	1,90	0,67	0	0,47	0,48	1
F01	47	4	1,85	0,89	0,02	0,46	0,46	0,95
Promedio	46,90	3,10	1,94	0,78	0,06	0,45	0,45	0,86

Donde, N: Número de individuos de la población, Na: Número de alelos diferentes, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, uHe: Heterocigosidad esperada imparcial, F: índice de fijación.

1.1.3 Población PAW

Los análisis de diversidad genética de la población de mejoramiento genético de la empresa Panamerican Woods (PAW) se llevaron a cabo basados en 10 loci polimórficos (B02, AC44, B07, C03, A06, A11, AC01, AG14, F01 y F02). Es importante indicar que hubo un 14% de datos faltantes para el locus C03 y 6% para el locus F01. Esta población fue la que tuvo en promedio, menor número de alelos diferentes (Na) y de alelos efectivos (Ne) con valores de 2,90 y 1,65 respectivamente, Aunque los loci B02, A06, A11, AC01, AG14 y F01 superaron el promedio, con 3 alelos efectivos y AC44 con 5 alelos efectivos. A diferencia de las

otras dos poblaciones de mejoramiento de las empresas investigadas, en esta población los valores de H_o y H_e no registraron valores significativamente diferentes entre sí, con un valor promedio de 0,36 y 0,35 respectivamente. El valor de índice de Shannon obtenido fue en promedio de 0,62, mientras que el índice de fijación promedio fue de 0,03 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Parámetros genéticos de la población de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis*) de la empresa Panamerican Woods (N = 50), Nandayure, Guanacaste, Costa Rica

Locus	N	Na	Ne	I	Ho	He	uHe	F
B02	50	3	1,76	0,77	0,38	0,43	0,44	0,12
AC44	50	5	2,91	1,27	0,66	0,66	0,66	- 0,01
B07	50	2	1,27	0,37	0,24	0,21	0,21	- 0,14
C03	43	2	1,29	0,38	0,26	0,22	0,23	- 0,15
A06	50	3	1,51	0,62	0,20	0,34	0,34	- 0,41
A11	50	3	1,51	0,58	0,42	0,34	0,34	-0,24
AC01	50	3	1,53	0,62	0,34	0,34	0,35	0,02

AG14	50	3	1,94	0,72	0,62	0,48	0,49	- 0,28
F01	47	3	1,74	0,76	0,45	0,42	0,43	- 0,05
F02	48	2	1,06	0,14	0,02	0,06	0,06	0,66
Promedi o	48,10	2,73	1,59	0,57	0,33	0,32	0,32	0,03

Donde, N: Número de individuos de la población, Na: Número de alelos diferentes, Ne: Número de alelos efectivos, I: Índice de Shannon, Ho: Heterocigosidad observada, He: Heterocigosidad esperada, uHe: Heterocigosidad esperada imparcial, F: índice de fijación.

2. Análisis de agrupamiento

2.1 Población BARCA

En la figura 2 se observa la distribución espacial de los genotipos (n=26) de la población de mejoramiento de la empresa BARCA, basada en su similitud genética (posible parentesco) a partir de 8 loci microsatélites. Donde a mayor proximidad espacial, mayor similaridad genética. Puede observarse dos grupos de genotipos principales, uno ubicado en su totalidad en el cuadrante III (BA9+BA15+BA13+BA8+BA24+BA12) y otro distribuido en el cuadrante I y II (BA10+BA20+BA5+BA17+BA4+BA21+BA14+BA23+BA1+BA2+BA3). Además de 3 genotipos individuales en el cuadrante IV (BA16, BA26 y BA 22).

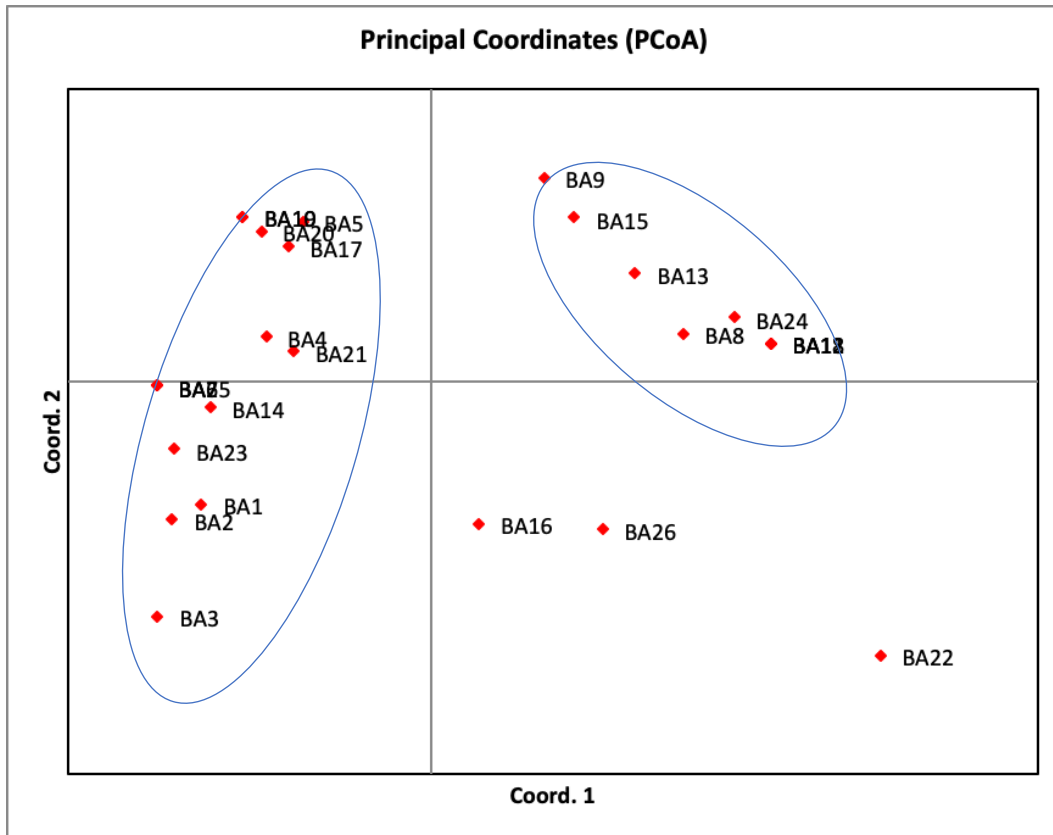


Figura 2. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa BARCA (N=26, 8 loci microsatélites), Parrita, Pacífico central de Costa Rica.

2.2 Población NovelTeak

En la figura 3 se observa la distribución espacial de los genotipos (n= 48) de la población de mejoramiento de la empresa Novelteak, basada en su similitud genética (posible parentesco) a partir de 10 loci microsatélites. Se observa un patrón de distribución en numerosos pequeños subgrupos o clústeres de material emparentado, y otras accesiones que se ubican espacialmente de manera individual, como reflejo de una identidad genética diferente y única. La dispersión espacial de los genotipos de la población como un todo, no se define de manera particular en algún patrón, sino que ocupan todos los cuadrantes.

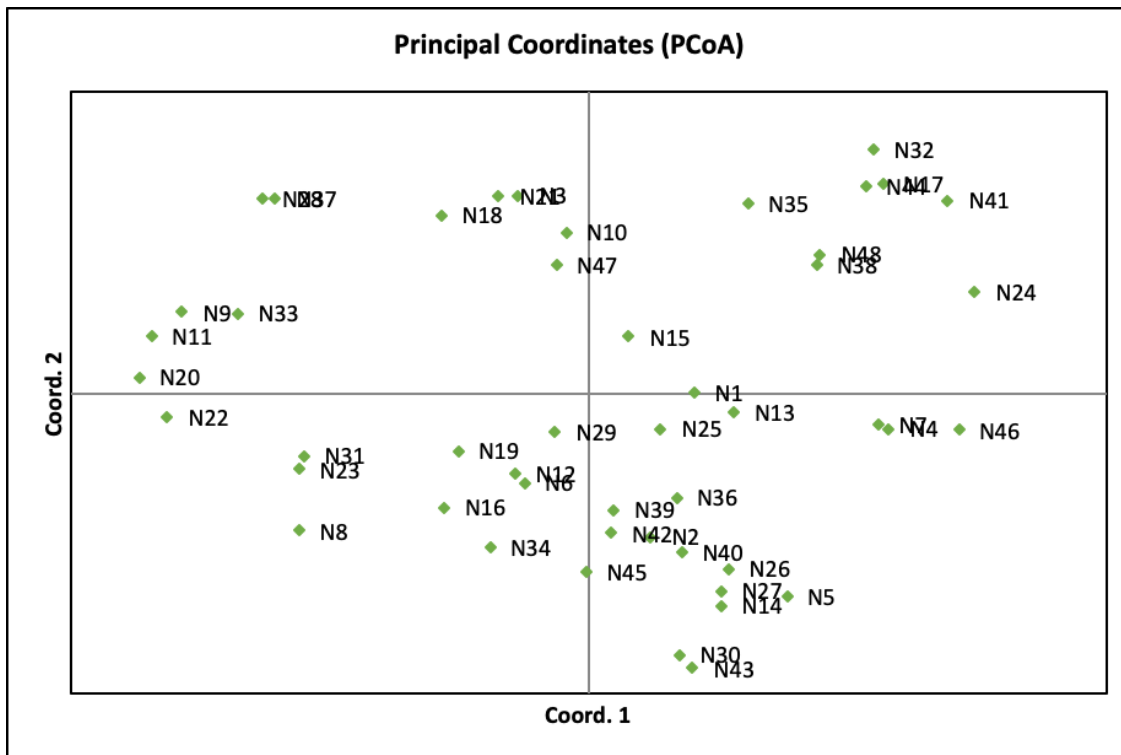


Figura 3. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa Novelteak (N=48, 10 loci microsatélites), Guanacaste, Costa Rica.

2.3 Población PAW

En la figura 4 se observa la distribución espacial de los genotipos (n=50) de la población de mejoramiento de la empresa PAW basada en su similitud genética (posible parentesco) a partir de 10 loci microsatélites. No se observa un patrón de distribución espacial definido en subgrupos o clústeres, sino más bien como un gran subgrupo que aglomera casi al 80% de los genotipos y 11 genotipos alejados, con una marcada diferenciación genética. Las accesiones PAW25+PAW36+PAW44 y PAW25+PAW47 formando clústeres de menor tamaño (posiblemente estén emparentados), y PAW 37, PAW47 y PAW49 son muestra de esto.

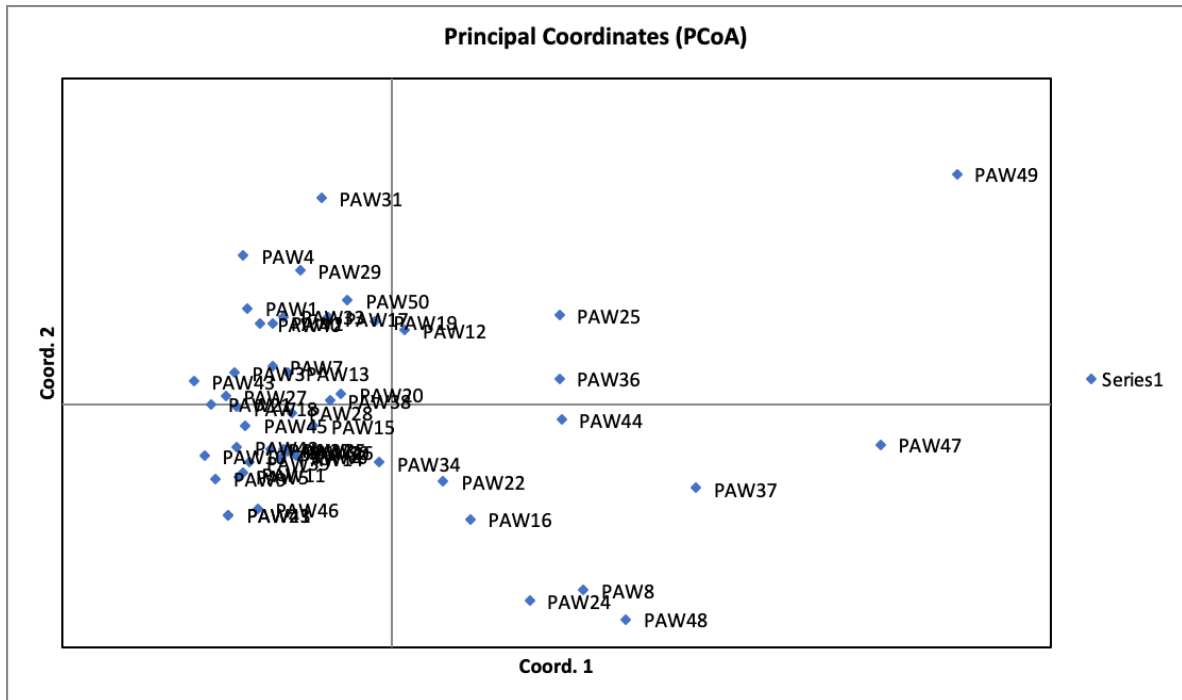


Figura 4. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la población de mejoramiento genético de teca de la empresa PAW ($n=50$, 13 loci microsátélites), Guanacaste, Costa Rica.

ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL

Diversidad genética

Al analizar todas las poblaciones juntas, se puede observar que tanto el número de alelos diferentes (N_a) como el número de alelos efectivos (N_e) en todas es muy similar. No hay alelos comunes presentes en más del 50% en ninguna de las poblaciones, pero BARCA es la población que tiene más alelos privados. En cuanto a heterocigosidad esperada corregida para muestras pequeñas (uHe) (Nei 1978),

los valores son bastante similares para las tres poblaciones y rondan desde 0,38 hasta 0,45.

Cuadro 6. Parámetros genéticos de las poblaciones de mejoramiento genético de teca (*Tectona grandis*) de las empresas BARCA, NovelTeak y PAW (N = 124), Costa Rica

Población	Población			
	BARCA	NovelTeak	PAW	Promedio
Na	3	3,12	3	3,04
Na Frec \geq 5%	2,38	2,88	2,62	2,62
Ne	1,85	1,96	1.71	1,84
I	0,70	0,78	0,67	0,71
No. de alelos privados	1,25	0,62	0,62	0,83
No. Alelos comunes (\leq25%)	0	0	0	0
No. Alelos comunes (\leq 50%)	0	0	0	0
He	0,41	0,44	0,38	0,41

uHe	0,42	0,45	0,38	0,42
-----	------	------	------	-------------

Al realizar el análisis de comparación entre genotipos que coinciden y genotipos únicos se puede observar que al aumentar la cantidad de loci amplificados, se puede discriminar entre mayor cantidad de genotipos. Amplificando 5 loci se pueden diferenciar más de 50 genotipos. Además, es evidente que amplificar 8 loci hacer posible diferenciar los genotipos de las tres poblaciones (Figura 5).

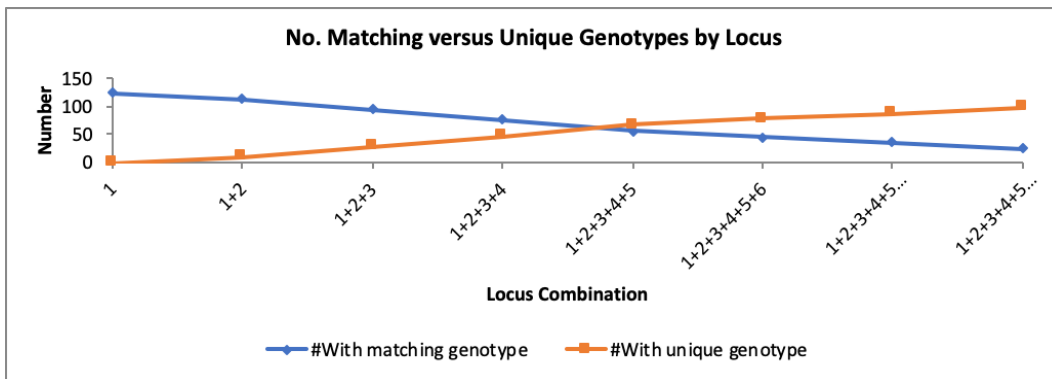


Figura 5. Comparación entre genotipos que coinciden y genotipos únicos incrementando combinaciones de 8 loci. Donde el eje x representa la combinación de loci amplificados, el eje y la cantidad de genotipos, la línea azul los genotipos que coinciden y la línea naranja los genotipos únicos.

Estructura Genética

Análisis Molecular de Varianza (AMOVA) y diferenciación genética

Al analizar la varianza molecular, se obtuvo que la varianza entre individuos de una misma población es del 71%, mientras entre poblaciones es del 29% (Anexo 1).

Según los valores obtenidos de distancia genética de Nei, las poblaciones más cercanas genéticamente son NovelTeak y PAW, que comparten casi un 60% de su información genética. Por lo contrario, BARCA y NovelTeak comparten solamente un 10% de su información genética y BARCA con PAW, comparten menos de un 15% (Cuadro 7).

Cuadro 7. Distancia genética de Nei para tres poblaciones de teca pertenecientes a las empresas BARCA, NovelTeak y PAW.

BARCA	NovelTeak	PAW	
0			BARCA
0,90	0		NovelTeak
0,86	0,42	0	PAW

El coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) sugiere que BARCA es la población más alejada de las otras dos poblaciones, con valores de 0,26 y 0,27 (cuadro 8). Mientras que entre las poblaciones PAW y Novelteak su diferenciación es de un 17%.

Cuadro 8. Coeficiente de diferenciación genética (F_{st}) para tres poblaciones de teca pertenecientes a las empresas BARCA, NovelTeak y PAW.

BARCA	NovelTeak	PAW	
0			BARCA

0,26	0		NovelTeak
0,27	0,17	0	PAW

Agrupamiento según Análisis de Coordenadas Principales (PCoA)

Al evaluar las tres poblaciones en conjunto (Figura 6), se puede observar claramente la existencia de tres poblaciones diferentes genéticamente. Se puede notar cómo la población BARCA exhibe un patrón marcado de diferenciación o distancia genética mayor con respecto a las otras dos poblaciones. Todos sus integrantes se localizan en el cuadrante IV. Mientras que las accesiones de las poblaciones PAW y Novelteak, se aproximan hasta llegar inclusive a una zona de contacto entre algunos de sus genotipos.

Las accesiones de Novelteak exhiben no solo la mayor dispersión espacial, como reflejo de su mayor variabilidad genética interna, sino también una mayor distancia promedio entre sus genotipos. La población BARCA por el contrario, exhibe una distancia genética interna muy estrecha entre sus propias accesiones.

Los resultados del análisis de coordenadas principales son consistentes con respecto a los parámetros distancia genética de Nei y el coeficiente de diferenciación genética (F_{st}), donde los tres señalan a la población BARCA como la más distante, la de menor diversidad genética interna, la que comparte menos elementos genéticos con las otras dos poblaciones de mejoramiento genético.

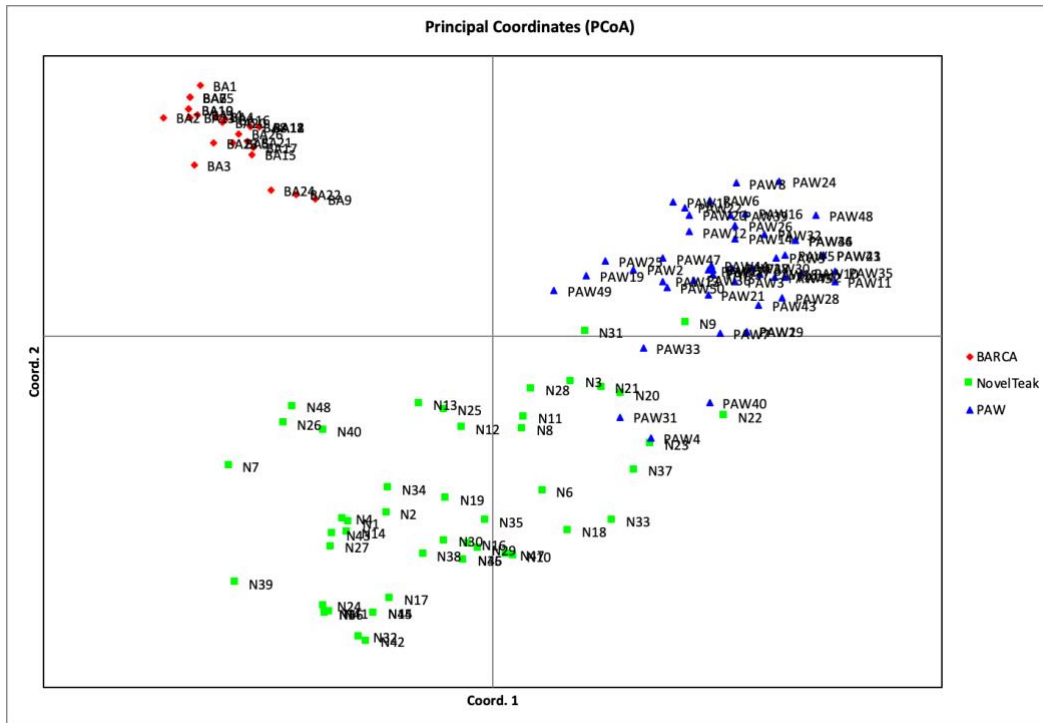


Figura 6. Análisis de agrupación por similitud genética con base en coordenadas principales (PCoA), en la poblaciones de mejoramiento genético de teca de las empresas BARCA, Novelteak y PAW (13 loci microsatélites), Guanacaste, Costa Rica.

Agrupamiento según Análisis de Structure

Para evaluar la relación genética existente entre los individuos de las 3 poblaciones de mejoramiento y conocer la estructura que mejor los define, se hizo un análisis de agrupamiento bayesiano con el programa STRUCTURE. Los resultados indican que el modelo que mejor define al programa global de mejoramiento genético de GENFORES, es el que sugiere la existencia de tres subpoblaciones claramente diferenciadas por su estructura genética propia, tal y como se muestra mediante el parámetro $\Delta K=3$ del software Structure (Figura 7). Las tres poblaciones definidas corresponden a cada uno de los programas de mejoramiento genético de cada empresa participante.

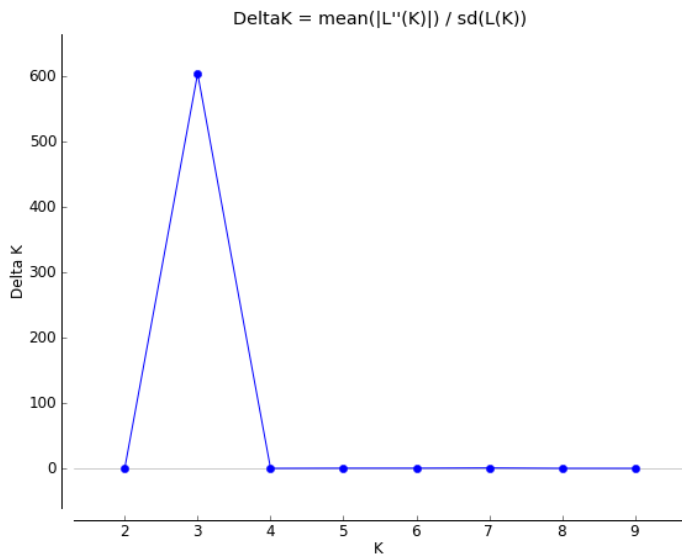


Figura 7. Determinación del valor ΔK más probable que define el número de poblaciones genéticamente diferentes, en el programa de mejoramiento genético de teca de GENFORES en Costa Rica, con base en el programa Structure Harvest.

Sin embargo, hay algunos individuos de las poblaciones NovelTeak y PAW que parecen estar significativamente emparentados, debido a que en el diagrama de asignación de probabilidades, se puede observar que el modelo de mezcla deja en evidencia algún grado de introgresión de la población PAW en NovelTeak y viceversa. (Figura 8).

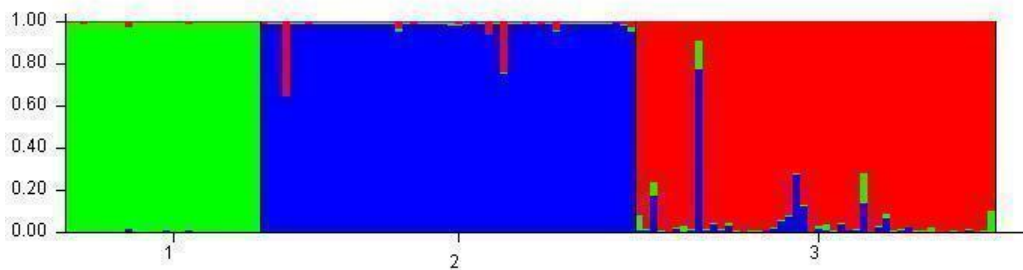


Figura 8. Diagrama de barras sobre la probabilidad de agrupamiento poblacional (K), calculada con el programa STRUCTURE, para los individuos de las tres poblaciones de mejoramiento genético de teca en GENFORES, Costa Rica.

DISCUSIÓN

ANÁLISIS INTRAPOBLACIONAL

Diversidad genética

Población BARCA

Para esta población la diversidad genética determinada por el número de alelos diferentes (N_a) fue baja en contraste con lo que se ha reportado para *Tectona grandis* en otros estudios. Fofana *et al.* 2009 encontraron un máximo de 19 alelos diferentes, e incluso se ha reportado un rango de entre 10 y 35 alelos diferentes (Minn *et al.* 2014). Esta baja diversidad genética determinada por la pequeña cantidad de alelos efectivos se puede deber a que los estudios han sido realizados evaluando poblaciones naturales, con un acervo genético más amplio, que el de poblaciones sintéticas en mejoramiento genético. Esto concuerda con los resultados obtenidos por Alcântra y Veasey (2013), quienes encontraron un rango de entre 3 y 7 alelos por locus en poblaciones de teca introducidas en localidades fuera de su origen natural o exótico.

En cuanto a la diversidad genética dada por la heterocigosidad observada (H_o) se obtuvieron valores desde 0,04 hasta 0,92; con un promedio de 0,46. Para poblaciones naturales de teca se han reportado valores que van desde 0,24 hasta 0,82 (Fofana *et al.* 2009). Minn *et al.* (2014) registraron valores desde 0,31 hasta 0,79 para la H_o . En poblaciones exóticas se han obtenido valores desde 0,10 a 0,5

con un promedio de 0,28 (Alcântra *et al.* 2013). Adicionalmente, se puede ver que los resultados obtenidos demuestran que en la mayoría de los loci el valor de H_o fue mayor que la H_e (Cuadro 3). Contrario a lo que se ha observado en otros estudios con poblaciones exóticas, que presentan valores de heterocigosidad observada, menores al promedio de heterocigosidad esperada para la mayoría de los loci (H_o promedio= 0,28 y H_e promedio=0,46; respectivamente) (Alcântra *et al.* 2013). Según Leshner *et al.* (2018), valores de heterocigosidad observada inferiores a los de heterocigosidad esperada, implica más apareamientos endogámicos dentro de la población evaluada. La teca, es un árbol monoico que posee flores polinizadas principalmente por insectos. Por tanto, en su gran mayoría ocurrirá la polinización cruzada (Minn *et al.* 2014), por lo que se espera que la endogamia sea baja. Sin embargo, se ha encontrado que los polinizadores suelen recorrer distancias cortas y polinizar árboles cercanos, que probablemente están emparentados (Tangmitcharoen *et al.* 2009). Por esto es que cobra relevancia la procedencia de los árboles seleccionados inicialmente para conformar la población.

El índice de Shannon (I) promedio obtenido fue de 0,69. En contraste, en poblaciones naturales de teca se han reportado valores más bajos, desde 0,41 hasta 0,50 (Ansari *et al.* 2012). En poblaciones de árboles de *Tectona grandis* seleccionados en programas de mejoramiento genético, se obtuvo un valor de I de 0,59, que también supera a los reportados para poblaciones naturales (Mahesh *et al.* 2016). Estos valores sugieren una diversidad genética relativamente para una población exótica, cuyo origen se espera que haya sido a partir de una base genética muy estrecha.

Con respecto al índice de fijación (F), en este estudio se obtuvo un valor promedio de -0,149. Solo en dos de los ocho loci se obtuvieron valores positivos. En teca se ha reportado un valor promedio de F de 0,036 (Hansen *et al.* 2015). Valores negativos de F indican que hay heterocigosidad reducida dentro de la población (donde la H_o es menor que la H_e), lo que indica que los valores de consanguinidad son altos (Ramírez-Reveco *et al.* 2016). Los valores de F se espera que sean mayores en poblaciones establecidas a partir de individuos seleccionados con

respecto a poblaciones naturales (0,134 y 0,119 respectivamente) (Minn *et al.* 2014). Los resultados obtenidos para estos estadísticos concuerdan con lo discutido anteriormente, es probable que el acervo genético inicial del cual se seleccionaron los árboles con características superiores fuera estrecho y por ende, la consanguinidad de esta población sea alta y su diversidad genética baja.

Población NovelTeak

Para esta población, los resultados de diversidad genética dada por N_a son muy similares a los que se obtuvieron para la población de la empresa BARCA, al tratarse también de una población de mejoramiento, donde el acervo genético esperado es que sea más reducido que en una población natural. Sin embargo, al analizar la diversidad genética de esta población desde el punto de vista de la H_e y H_o , contrario a la población de la empresa BARCA, en esta se obtuvieron valores promedio de heterocigosidad muy bajos ($H_e = 0,45$; $H_o = 0,06$). Donde en algunos loci se registró incluso H_o de 0 (A11, AC01 y Da12). Esto podría deberse al supuesto planteado por Leshner *et al.* 2018, de que a mayor déficit de heterocigosidad implica mayor endogamia.

En poblaciones de mejoramiento genético, por su tamaño finito (en este caso $n=26$), se puede generar una depresión endogámica y pérdida de variabilidad (Sahagún-Castellanos y García-Mezano 2009). Esto debido a que la variabilidad genética se correlaciona con el tamaño de la población. Debido a que el mejoramiento genético involucra una reducción de tamaño de población vía selección, las poblaciones de mejoramiento genético suelen presentar una marcada erosión genética (Cornelius *et al.* 2006).

Por otra parte, para esta población se obtuvo valores de I y F altos (0,78 y 0,86 respectivamente), lo que indica que hay poca heterocigosidad, siendo esta incluso 0 para varios loci (Cuadro 4). Estos valores de diversidad genética sugieren que el acervo genético del cual se seleccionó esta población era reducido o el diferencial de selección fue más alto, es decir, se hizo una selección más estricta de los

mejores árboles. Lo que implica una baja diversidad genética y la necesidad de promover intercambios de material genético élite con otras empresas miembro de la cooperativa. Sin embargo, para ser una población sintética, los valores de diversidad son relativamente altos y es esta la población más diversa de las tres.

Población PAW

Para esta población, la diversidad genética dada por N_a fue aún menor que en las poblaciones anteriores (promedio de 2,90), lo que concuerda con lo mencionado anteriormente sobre el acervo genético de los árboles seleccionados inicialmente.

En cuanto a la diversidad genética determinada por la H_o y H_e , se registró un equilibrio en la heterocigosidad, sin déficit, por el contrario, los valores esperados concuerdan en gran medida con los observados ($H_o=0,33$; $H_e=0,32$). Estos resultados se encuentran en el rango reportado para poblaciones naturales de *Tectona grandis* (Fofana *et al.* 2009; Minn *et al.* 2014).

En cuanto al índice de Shannon (I) y el índice de fijación (F), se obtuvo valores de 0,57 y 0,03 respectivamente. A pesar de que el valor promedio de F es un valor positivo, se obtuvieron valores negativos en 7 de los 10 loci evaluados. Lo que sugiere que hay una baja heterocigosidad y por tanto, una diversidad genética baja.

En todas las poblaciones se obtuvieron valores de N_a bajos comparados con lo reportado para poblaciones naturales por tratarse de poblaciones de mejoramiento genético. Esto debido a que la selección de material provoca un acervo genético reducido.

Análisis de agrupamiento

Población BARCA

La distribución de esta empresa sigue un patrón de dispersión que coloca a los individuos en la periferia y ninguno hacia la intersección de los cuadrantes, eso sugiere la existencia de una estructura de la población diferenciada en dos subgrupos principales genéticamente diferentes (Figura 2).

Población NovelTeak

Para esta población, se observa un grupo de individuos con un patrón de distribución en varios grupos pequeños de material emparentado, mientras que el resto de la población se ubica de manera individual, como consecuencia de su identidad genética diferente y única (Figura 3). Lo que refleja una disimilitud genética considerable entre diferentes subpoblaciones, posiblemente explicado por un origen genético diferente.

Población PAW

La distribución espacial de los genotipos pertenecientes a la empresa PAW no presentan un patrón de distribución espacial definido en subgrupos, por el contrario, se observa un único subgrupo que contiene aproximadamente al 80% de la población; y algunos individuos que se alejan de ese subgrupo principal, por lo que probablemente corresponden a un material introducido de un origen genético diferente al resto (Figura 4). Lo que puede indicar que se compró semilla procedente de diferentes viveros.

ANÁLISIS INTERPOBLACIONAL

Diversidad genética

Al analizar todas las poblaciones juntas, se obtuvieron resultados de diversidad genética bastante similares entre sí (Cuadro 6). Sin embargo, el número de alelos diferentes es menor a lo que se ha reportado por otros autores (hasta 11,47 alelos, en promedio, por población) (Fofana *et al.* 2009). Además, aunque la diversidad genética dada por uHe es relativamente alta, también es menor a lo que se ha reportado (hasta 0,78, en promedio, por población) (Fofana *et al.* 2009). Esto indica que el material genético que se tiene en todas las poblaciones no es lo suficientemente diverso y, además de intercambiar material entre empresas, algo que podría ayudar en el programa de mejoramiento genético sería incluir material externo para así aumentar la diversidad.

Como se observa en la figura 4, cuanto mayor es el número de loci microsatélites que se utilizan, mayor es la capacidad para discriminar entre genotipos diferentes. A pesar de que los 8 loci comunes que se han investigado para las tres poblaciones permiten establecer su estructura genética, persiste un grupo pequeño de genotipos de las poblaciones de PAW y NovelTeak, que se podrían diferenciar mejor si se ampliara el número de loci a 13 de los reportados como polimórficos para teca.

Estructura genética

Análisis molecular de varianza (AMOVA) y diferenciación genética

Los resultados obtenidos en el AMOVA (varianza de 71% dentro de poblaciones y 29% entre poblaciones) son consistentes con lo reportado en otros estudios para *Tectona grandis* (Alcântra *et al.* 2013; Ansari *et al.* 2012; Minn *et al.* 2014; Prasetyo *et al.* 2020). Debido a que la teca se reproduce principalmente por polinización cruzada, podría explicar un aumento en los niveles de diferenciación genética dentro de las poblaciones, como contrapeso al aumento en la endogamia, debido al reducido tamaño de población (Alcântra y Veasey, 2013). Se especula sobre la fecha de introducción de la teca a Costa Rica y su procedencia, donde se indica que la compañía bananera realizó importaciones de semilla en 1943 y 1947 desde Trinidad y Tobago, con la que se establecieron pequeñas plantaciones en Quepos

y en Turrialba respectivamente (Keogh 1980; Murillo *et al.* 2013). La introducción de especies forestales es un fenómeno bien conocido y discutido ampliamente, debido a su efecto e impacto en el origen de nuevos programas de mejoramiento genético (Zobel, van Wyk, Stahl 1987). Fenómeno conocido como el desarrollo de razas locales (Land race) y su relación con la base genética inicial.

A partir de las introducciones en Quepos y Turrialba, el material se distribuyó a viveros y bancos de semillas. Las empresas BARCA, NovelTeak y PAW establecieron ensayos con material proveniente de esos viveros y bancos de semillas y seleccionaron sus árboles plus. El origen de las plantas fue muy probablemente de los rodales semilleros independientes, de los viveros de Hojanca y del Banco de Semillas del Centro Agrícola Cantonal de Hojanca (CACH), que eran en esa época (finales de los años 80 e inicios de los 90) la mejor fuente semillera de teca en el país (Barquero 1984; Murillo *et al.* 2019). Por lo que es posible pensar, que el origen genético de las plantaciones de estas empresas fuera de las mismas fuentes semilleras. Lo cual podría explicar la similitud genética entre algunos individuos de PAW y Novelteak, como se observa en la figura 5. La población de BARCA se separa claramente de las otras dos poblaciones. Su origen provino de un único vivero establecido por la misma empresa en la zona de Parrita, cuya semilla provino de uno o varios lotes comprados al Banco de Semillas del CACH (Resende, Murillo y Badilla, Capítulo I: Historia del mejoramiento genético forestal en Costa Rica, 2018).

Tomando en cuenta que la distancia genética de Nei indica valores altos, tanto entre BARCA y PAW, como entre BARCA y NovelTeak (0,86 y 0,90 respectivamente); mientras que por el contrario, un valor menor entre NovelTeak y PAW (0,42) (Cuadro 6), se puede afirmar que BARCA es la población más alejada genéticamente de las otras dos.

Del mismo modo el parámetro de diferenciación genética (F_{st}) mostró valores consistentes donde registró el valor más alto tanto entre BARCA y NovelTeak, como entre BARCA y PAW (0,26 y 0,27 respectivamente). Mientras que entre NovelTeak y PAW el valor de F_{st} fue de 0,17 (Cuadro 7). Estos resultados sugieren que la

población más alejada genéticamente de las demás es BARCA. Otros autores han reportado para poblaciones de *Tectona grandis* valores de F_{st} desde 0,013 hasta 0,188. Sin embargo, estos valores corresponden a poblaciones naturales, donde el coeficiente de diferenciación es menor que en las poblaciones introducidas (Fofana *et al.* 2014).

Agrupamiento según análisis de coordenadas principales (PCoA)

En el análisis de coordenadas principales (PCoA) se tiene que los primeros componentes explican el 22,71% y 20,78% de la variación genética total. Al presentar de forma gráfica la distribución espacial de las poblaciones según la distancia genética entre sus individuos, se puede confirmar que la población BARCA es la más alejada genéticamente de las otras dos poblaciones, ya que se encuentra aislada en el cuadrante I. Mientras que NovelTeak se encuentra en su mayoría en los cuadrantes III y IV, y PAW se encuentran casi en su totalidad en el cuadrante II. Sin embargo, entre los cuadrantes II y IV se puede observar un leve traslape entre estas dos poblaciones (genotipos PAW 29, PAW 40, PAW 31, PAW 4, PAW 7 y PAW 3 de la empresa PAW y N23, N22, N9 y N31 de la empresa NovelTeak), lo que refuerza la teoría de que las empresas NovelTeak y PAW obtuvieron de los mismos viveros parte del material que dio origen a sus plantaciones comerciales. De donde posteriormente fueron seleccionados los árboles plus. Mientras que las plantaciones de BARCA fueron establecidas en su mayoría a partir de plantas producidas por el propio vivero de la empresa, año con año, a partir de semilla comercial adquirida en los bancos de semillas locales. (Murillo, com. pers, febrero, 2020).

Agrupamiento según análisis de Structure

El análisis de agrupamiento espacial basado en métodos bayesianos que utiliza el software Structure, exhibe de manera concordante con los resultados discutidos anteriormente. Existe una probabilidad significativamente alta (Valor ΔK), de que el agrupamiento ideal de los individuos ocurre en tres poblaciones bien diferenciadas

(BARCA, NovelTeak y PAW) (Figura 7). Sin embargo, en la figura 6. (PcoA), se observa una ligera tendencia de introgresión de las poblaciones NovelTeak y PAW, explicado por su gran similitud o menor distanciamiento genético. Resultado que sustenta la hipótesis de la existencia de ancestros comunes entre ambas poblaciones de mejoramiento genético.

CONCLUSIONES

La población de mejoramiento de Panamerican Woods registra la menor diversidad genética de las tres investigadas, con la menor cantidad de alelos efectivos ($N_e = 1,59$). Mientras que la población de mejoramiento de Novelteak registra la mayor diversidad alélica ($N_e = 1,94$).

La población BARCA se diferencia genéticamente de las poblaciones de mejoramiento de las empresas Novelteak y PAW debido a un origen genético diferente.

Las poblaciones de PAW y Novelteak, exhiben una mayor cercanía genética entre sí y posiblemente comparten algunos ancestros comunes.

La población de mejoramiento genético de cada una de las tres empresas está genéticamente diferenciada con su estructura genética propia.

Un 70% de la variación genética ocurre dentro de las poblaciones y el restante 30% se debe a las diferencias entre las tres poblaciones investigadas.

RECOMENDACIONES

Aumentar la utilización del número de loci polimórficos a 13 para las tres poblaciones, con el propósito de aumentar la sensibilidad de los análisis poblacionales.

Las empresas miembro de GENFORES, deben focalizar esfuerzos de selección y cruzamiento dentro de su población de mejoramiento. Sin embargo, será de mucho beneficio aumentar el intercambio de material genético entre sus programas de mejoramiento para ampliar la variabilidad de la base poblacional.

BIBLIOGRAFÍA

- Aborisade, K; Aweto, A. 1990. Effects of exotic tree plantations of teak (*Tectona grandis*) and gmelina (*Gmelina arborea*) on a forest soil in south-western Nigeria (en línea). *Soil Use and Management*, 6(1):43-45. Consultado 20 de mar. 2020. Disponible en <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1475-2743.1990.tb00796.x>
- Alcântara, B; Veasey, E. 2013. Genetic diversity of teak (*Tectona grandis* LF) from different provenances using microsatellite markers (en línea). *Revista Árvore*, 37(4), 747-758. Consultado 8 de mar. 2020. Disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-67622013000400018&script=sci_arttext
- Alcántara, M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares (en línea). *Ecología molecular*, 541-566. Consultado 05 de mar. 2020. Disponible en <https://micrositios.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap18.pdf>
- Alfonso C; Campos J; Sánchez, G; Monsalvo, A; Clark, R. 2014. Manejo forestal y diversidad genética de *Pinus patula* Schiede ex Schltdl, & Cham, en Sierra Juárez, Oaxaca (en línea). *Madera y bosques*, 20(2), 11-22. Consultado 9 mar. 2020. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-04712014000200002&script=sci_arttext
- Anish, M; Anoop, R; Vishnu, B; Sreejith, Jijeesh, C. 2015. Effect of growth rate on wood quality of teak (*Tectona grandis* L. f.): a comparative study of teak grown under differing site quality conditions (en línea). *Journal of the Indian Academy of Wood Science* 12(1):81-88. Consultado 10 jul. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s13196-015-0147-1#citeas>

- Aranguren, J; Román, R; Isea, W; Villasmil, Y; Jordana, J. 2005. Los microsatélites (STR´ s), marcadores moleculares de ADN por excelencia para programas de conservación: una revisión (Microsatellites (STR's), ADN Molecular Markers for Excellency for conservation programs: A review) (en línea). Consultado 3 mar. 2020. Disponible en <https://tspace.library.utoronto.ca/handle/1807/7085>
- Arguedas, M; Rodríguez, M; Guevara, M. 2015. Plagas y enfermedades en plantaciones de teca en Centroamérica (en línea). Instituto Tecnológico de Costa Rica, Guayaquil, Ecuador. Consultado 10 jul. 2019. Disponible en [file:///C:/Users/Laura%20Pez/Downloads/DialnetPlagasYEnfermedadesEnPlantacionesDeTecaTectonaGran-4130581%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Laura%20Pez/Downloads/DialnetPlagasYEnfermedadesEnPlantacionesDeTecaTectonaGran-4130581%20(1).pdf)
- Azofeifa, A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico (en línea). *Agronomía mesoamericana*, 221-242. Consultado 15 mar. 2020. Disponible en <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5163>
- Barquero, M. 1984. Establecimiento de rodales semilleros en el Centro Agrícola Cantonal de Hojancha, Guanacaste (en línea). *Práctica de Especialidad*. Cartago, Costa Rica, ITCR. 85 p. Consultado 11 mar. 2020. Recuperado de
- Barrantes, A; Ugalde, A. 2015. Balanza comercial y principales tendencias de las exportaciones e importaciones de madera y muebles de madera en Costa Rica. *Estadísticas 2015* (en línea). ONF. Consultado 17 jul. 2019. Disponible en <https://www.onfcr.org/media/uploads/documents/balanza-comercial-2015.pdf>
- Cadima, X., Veramendi, S; Gabriel, J. 2013. Uso de marcadores moleculares microsatélite para el análisis de la diversidad genética de papa nativa de Bolivia (en línea). *Journal of the Selva Andina Research Society*, 4(1):18-30. Consultado 4 mar. 2020. Disponible en http://www.scielo.org.bo/scielo.php?pid=S2072-92942013000100003&script=sci_arttext

- Camacho, A; Ramírez, H; de los Santos, H; Zamudio, F. 2013. Tablas de rendimiento para teca (*Tectona grandis* L.) en el Estado de Campeche (en línea). *Revista mexicana de ciencias forestales*, 4(19):92-101. Consultado 4 mar. 2020. Disponible en <https://revistas.ucr.ac.cr/index.php/agromeso/article/view/5163>
- CATIE Soluciones para el ambiente y desarrollo. 2013. Las plantaciones de teca en América Latina: Mitos y realidades (en línea). Consultado 01 mar. 2020. Disponible en <http://www.ibiologia.unam.mx/gela/tecalibro.pdf>
- FAO Food and Agricultural Organisation of United Nations. 2013 Overview of problems in teak plantation establishment (en línea). News article. Consultado en 10 jul. 2019. Disponible en <http://www.fao.org/3/AC773E/ac773e08.htm>
- Fofana, I; Lidah, Y; Diarrassouba, N; N'guetta, S., Sangare, A; Verhaegen, D. 2008. Genetic structure and conservation of Teak (*Tectona grandis*) plantations in Côte d'Ivoire, revealed by site specific recombinase (SSR) (en línea). *Tropical Conservation Science*, 1(3):279-292. Consultado 9 mar. 2020. Disponible en <https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1177/194008290800100308>
- Fofana, I; Ofori, D; Poitel, M; Verhaegen, D. 2009. Diversity and genetic structure of teak (*Tectona grandis* Lf) in its natural range using DNA microsatellite markers (en línea). *New forests*, 37(2):175-195. Consultado 6 mar. 2020. Disponible en https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-008-9116-5&casa_token=zLm4Gr55uVIAAAAAA:E7NiUi0xRvkvfyVZLZ9alkpw7q73f7pIC1VRQRk_2-QA-mlwhJLdze86DRZuDLZaaYgY5OKUI0myy6clZ8
- Fofana, J; Diarrassouba, N; Koffi, K; Dago, N; Adou, K; N'guetta, P. 2014. Evaluation de quelques descripteurs Morphologiques des populations de teck (*Tectona grandis* L. F) Verbenaceae de la forêt classée de la Téné (Côte d'Ivoire) (en línea). *Agronomie Africaine*, 26(1):23-33. Consultado 9 mar. 2020. Disponible en <https://www.ajol.info/index.php/aga/article/view/104430>

- Fuentes, S; Legaria; Ramírez, C. 2019. Estructura genética de poblaciones de *Pinus cembroides* de la región central de México (en línea). *Revista fitotecnia mexicana*, 42(1):57-65. Consultado 10 mar. 2020. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802019000100057&script=sci_arttext&tlng=pt
- González, B. 2007. Caracterización genética con microsatélites de un ensayo de progenie de Teca (*Tectona grandis Linn f*) en San Mateo de Alajuela (en línea). Tesis Bach. Cartago, Costa Rica, TEC. Consultado 21 jul. 2019. Disponible en <https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/556/TESIS%20TECA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- Grover, A; Sharma, P. 2016. Development and use of molecular markers: past and present (en línea). *Critical reviews in biotechnology*, 36(2):290-302. Consultado 3 mar. 2020. Disponible en https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.3109/07388551.2014.959891?casa_token=fc6a9S5hlGcAAAAA:9FseTUak4o-kmfY52yzKkuUDcAHiQVvoekPZaofnLTLcXc6tk5lsYlsX1olxq3-tUFir0DjntJfZE1IQ2w
- Gutiérrez, R; Romero, E; Cunuhay, P; Blanco, G; Fonseca, C. 2008. Análisis comparativo de las propiedades físico-mecánicas de la madera de teca (*Tectona grandis LF*) de Quevedo y Balzar (en línea). *Revista Ciencia y Tecnología*, 1(2):55-63. Consultado 20 mar. 2020. Disponible en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4056143>
- Hansen, O; Changtragoon, S; Ponoy, B; Kjær, E; Finkeldey, R; Nielsen, K; Graudal, L. 2015. Genetic resources of teak (*Tectona grandis Linn. f.*)—strong genetic structure among natural populations (en línea). *Tree Genetics & Genomes*, 11(1):802. Consultado 11 mar. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-014-0802-5>
- Jiménez, P; Collada, C. 2000. Técnicas para la evaluación de la diversidad genética y su uso en los programas de conservación (en línea). *Forest*

Systems, 9(4):237-248. Consultado 10 mar. 2020. Disponible en <https://recyt.fecyt.es/index.php/IA/article/view/2665>

Jonah, P; Bello, L; Lucky, O; Midau, A; Moruppa, S. 2011. The importance of molecular markers in plant breeding programmes (en línea). *Global Journal of Science Frontier Research*, 11(5), 5-12. Consultado 11 mar. 2020. Disponible en <https://pdfs.semanticscholar.org/becc/af3e4e09154fe955dfcab6be7392ab98b182.pdf>

Keogh, R. M. (1978). Teak (*Tectona grandis*) provenances of the Caribbean, Central America, Venezuela and Colombia. *Unpublished. Original document at FAO headquarters, Rome.*

Kertadikara, A; Prat, D. 1995. Isozyme variation among teak (*Tectona grandis* Lf) provenances (en línea). *Theoretical and Applied Genetics*, 90(6), 803-810. Consultado 15 mar. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/BF00222015>

Kumar, P; Gupta, V; Misra, A., Modi, D; Pandey, B. 2009. Potential of molecular markers in plant biotechnology (en línea). *Plant Omics*, 2(4), 141. Consultado 3 mar. 2020. Disponible en <https://search.informit.com.au/documentSummary;dn=090706285698938;res=IELHSS>

Leshner, J. M; Martínez, J; Orduña, P; Hernández, A. (2018). Diversidad genética del cedro rojo (*Cedrela odorata*) en el estado de Tabasco, México (en línea). *Bosque (Valdivia)*, 39(3): 411-417. Consultado 20 mar. 2020. Disponible en https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0717-92002018000300411&script=sci_arttext&tlng=e

Mahesh, S; Vaishnav, V; Kumar, P; Mohammad, N; Ansari, S. 2016. Characterization and validation of teak plus trees ramets of national teak germplasm bank through microsatellites (en línea). *Tropical plant research* 3(1):213–220. Consultado 15 mar. 2020. Disponible en <http://www.tropicalplantresearch.com/archives/2016/vol3issue1/28.pdf>

- Minn, Y; Prinz, K; Finkedey. 2014. (en línea). *Tree genetics & genomes* 10(5):1435-1449). Consultado 21 jul. 2019. Disponible en <http://www.tropicalplantresearch.com/archives/2016/vol3issue1/28.pdf>
- Molina, S; Alfaro, C; Murillo, O; Badilla, Y; Luján, R. 2019. Evaluación del comportamiento de clones de *Tectona grandis* L. f. en suelos vertisoles de la Península de Nicoya, Costa Rica (en línea). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 16(38):24-34. Consultado 20 mar. 2020. Disponible en https://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S2215-25042019000100024&script=sci_arttext
- Molina, F. 2017. Comportamiento de clones de teca (*Tectona grandis* Linn) a los 4, 5 años en Upala, Zona Norte de Costa Rica (en línea). Tesis Lic. Cartago, Costa Rica, TEC. Consultado 20 jul. 2019. Disponible en https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/9394/comportamiento_clones_teca_tectona_grandis.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- Mollinedo, M; Herrera, M; Muñoz, F. 2016. Caracterización del crecimiento de plantaciones jóvenes de teca (*Tectona grandis* Linn f.) y estimación de curvas de índice de sitio en el área septentrional de la República de Guatemala (en línea). *Madera y bosques* 22(2):89-103. Consultado 18 jul. 2019. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-04712016000200089
- Murillo, O. 18 mar. 2020. Poblaciones de GENFORES (llamada telefónica). Cartago, Costa Rica
- Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2010. GENFORES, desde el TEC hacia el desarrollo empresarial internacional (en línea). *Investiga. TEC*, (9):10. Consultado 11 mar. 2020. Disponible http://kimuk.conare.ac.cr/Record/RTEC_cb537bc9e4f36173d8cf402523dbe244
- Murillo, O; Badilla, Y; Rojas, F. 2016. Desarrollo del mejoramiento genético forestal en Costa Rica y liderazgo regional con especies tropicales En: XIV CONAFA (en línea). Consultado 15 mar. 2020. Disponible en

<https://www.tec.ac.cr/publicaciones/desarrollo-mejoramiento-genetico-forestal-costa-rica-liderazgo-regional-especies>

- Murillo, O; Resende, M; Badilla, Y; Gamboa, J. 2019. Genotype by environment interaction and selection in teak (*Tectona grandis* L.) in Costa Rica. *Silvae Genetica*. (68):116-121. Consultado 10 mar. 2020. Recuperado de https://www.researchgate.net/publication/337985442_Genotype_by_environment_interaction_and_teak_Tectona_grandis_L_selection_in_Costa_Rica
- Murillo, O; Wright, J; Monteuis, O; Montenegro, F. 2013. Mejoramiento genético de la teca en América Latina (en línea) 86 p. Consultado 11 mar. 2020. Recuperado de <https://agritrop.cirad.fr/571671/1/tecalibro.pdf>
- Myles, S; Boyko, A; Owens, C; Brown, P; Grassi, F; Aradhya, M; Bustamante, C. 2011. Genetic structure and domestication history of the grape (en línea). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(9):3530-3535. Consultado 11 mar. 2020. Disponible en <https://www.pnas.org/content/108/9/3530.short>
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals (en línea). *Genetics* 89:583–590. Consultado 8 mar. 2020. Disponible en <https://www.genetics.org/content/89/3/583.short>
- Nieto, J; Hernández, S; Motte, E; Mayek, N. 2014. Análisis de la diversidad genética del germoplasma de teca (*Tectona grandis* L. f.) en Ecuador (en línea). *Revista mexicana de ciencias forestales* 5(21):108-121. Consultado 10 julio 2019. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11322014000100008
- Prado, E. 2012. Establecimiento y evaluación de una plantación forestal con mezcla de especies considerando su gremio ecológico, en la Virgen de Sarapiquí, Costa Rica (en línea). Tesis Lic. Cartago, Costa Rica, TEC. Consultado 13 jul. 2019. Disponible en https://repositoriotec.tec.ac.cr/bitstream/handle/2238/2916/Informe_Final.pdf?sequence=1&isAllowed=y

- Prasetyo, E; Indrioko, S; Na'iem, M; Matsui, T.; Matsuo, A; Suyama, Y; Tsumura, Y. 2020. Genetic diversity and the origin of commercial plantation of Indonesian teak on Java Island (en línea). *Tree Genetics & Genomes*, 16(2), 1-14. Consultado 8 mar. 2020. Recuperado de https://idp.springer.com/authorize/casa?redirect_uri=https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-020-1427-5&casa_token=d2CXouxe3S8AAAAA:6LP1XkERAFgTdr6TOEs1sDvrtGK9kijZVxZaGcMr1RezGVhh0YSDv4NMGV7ovpb6DI6ZnrAzmBXH-Ae40jQ
- Prinz, K; Finkeldey, R. 2014. Genetic variation of teak (*Tectona grandis* Linn. f.) in Myanmar revealed by microsatellites (en línea). *Tree genetics & genomes* 10(5):1435-1449. Consultado 18 jul. 2019. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11295-014-0772-7>
- Ramírez-Reveco, A; Hartley, R; Ortiz, M; Ulloa, O; Núñez, I. 2016. Diversidad genética al interior de los núcleos reproductivos de las razas pesadas del Plan Nacional de Fomento Equino basado en el análisis de loci microsatélites (en línea). *Archivos de medicina veterinaria*, 48(1):11-17. Consultado 7 mar. 2020. Disponible en https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2016000100002&script=sci_arttext&tlng=e
- Resende, M; Badilla, Y. 2018. Genética Cuantitativa y Selección en el Mejoramiento Forestal (en línea). *Editorial Tecnológica de Costa Rica. Cartago, Costa Rica*. Consultado 6 mar. 2020. Disponible en <https://bco.catie.ac.cr:8086/genetica-cuantitativa-y-seleccion-en-el-mejoramiento-forestal>
- Rimieri, P. 2017. La diversidad genética y la variabilidad genética: dos conceptos diferentes asociados al germoplasma y al mejoramiento genético vegetal (en línea). *BAG. Journal of basic and applied genetics*, 28(2):7-13. Consultado 5 mar. 2020. Disponible en https://sag.org.ar/jbag/wp-content/uploads/2019/11/A1_7-13-2.pdf
- Rojas, F; Murillo, O; Aguilar, G; Rocha, O Araya, E. 2012. Análisis genotípico en *Vochysia guatemalensis* Donn Smith (Vochysiaceae) mediante microsatélites (en línea). *Revista Forestal Mesoamericana Kurú*, 8(20), pág. 9-19.

Consultado 12 mar. 2020 Disponible en
<https://revistas.tec.ac.cr/index.php/kuru/article/view/374>

Rugeles, P. 2011. Genotipificación mediante marcadores moleculares RAMs (microsatélites amplificados al azar) y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia Kunth* (en línea). Tesis MsC. Colombia, Universidad Nacional de Colombia. Consultado 20 jul. 2019. Disponible en <http://bdigital.unal.edu.co/4967/1/7508005.2011.pdf>

Sahagún-Castellanos, J; García-Mezano, F. 2009. El coeficiente de endogamia de una población bajo selección masal (en línea). *Agrociencia*, 43(2):119-132. Consultado 3 mar. 2020. Disponible en http://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952009000200004&script=sci_arttext

Sánchez, J. 2013 *Estudio de la diversidad genética en Eucalyptus globulus (Labill.) empleando marcadores moleculares tipo microsatélite (SSR)* (en línea) (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia). Consultado 3 mar. 2020. Disponible en <http://www.bdigital.unal.edu.co/44371/>

Schargel, I; Hernando, G. 2008. Crecimiento de una plantación de teca (*Tectona grandis LF*) proveniente de dos fuentes de material vegetativo (en línea). *Unellez de Ciencia y Tecnología* 24:45-50. Consultado 13 jul. 2019. Disponible en https://www.academia.edu/3432185/CRECIMIENTO_DE_UNA_PLANTACION_DE_TECA_Tectona_grandis_LF_PROVENIENTE_DE_DOS_FUENTES_DE_MATERIAL_VEGETATIVO

Shrestha, M; Volkaert, H; Straeten, D. 2005. Assessment of genetic diversity in *Tectona grandis* using amplified fragment length polymorphism markers (en línea). *Canadian Journal of Forest Research*,c35(4):1017-1022. Consultado 8 mar. 2020. Disponible en https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/x05-033#.Xo_kxS3mFQI

- Sreekanth, P; Balasundaran, M; Nazeem, P; Suma, T. 2012. Genetic diversity of nine natural *Tectona grandis* Lf populations of the Western Ghats in Southern India (en línea). *Conservation genetics*, 13(5):1409-1419. Consultado 11 mar. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s10592-012-0383-5>
- Tangmitcharoen, S; Tasen, W; Owens, J; Bhodthipuks, J. 2009. Fruit set as affected by pollinators of teak (*Tectona grandis* L. f.) at two tree spacings in a seed orchard (en línea). *Songklanakarin Journal of Science & Technology*, 31(3). Consultado 2 mar. 2020. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Suwan_Tangmitcharoen/publication/26842207_Fruit_set_as_affected_by_pollinators_of_teak_Tectona_grandis_L_f_at_two_tree_spacings_in_a_seed_orchard/links/5443d16d0cf2a6a049ab0418.pdf
- Vaishnav, V; Mohammad, N; Wali, S; Kumar, R; Tripathi, S; Negi, M; Ansari, S. 2015. AFLP markers for analysis of genetic diversity and structure of teak (*Tectona grandis*) in India (en línea). *Canadian Journal of Forest Research*, 45(3):297-306. Consultado 20 mar. 2020. Disponible en https://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/cjfr-2014-0279#.Xo_IFS3mFQI
- Varghese, M; Nicodemus, A; Nagarajan, B. 2003. Fertility variation and dynamics of two clonal seed orchards of teak (en línea). In *Quality Timber Products of Teak from Sustainable Forest Management, Proceedings of the IUFRO International Conference held between 2-5*. Consultado 16 mar. 2020. Disponible en <https://link.springer.com/article/10.1007/s11056-005-2178-8>
- Volkaert, H (Centre for Agricultural Biotechnology, Kasetsart University Kampaengsaen Campus, Kampaengsaen, NakornPathom, 73140, THAILAND) Unpublished Data.