



Vicerrectoría de Investigación y Extensión  
Dirección de Proyectos

**Informe final de proyectos de investigación y extensión  
Documento 1**

Proyecto de investigación:  
**Desarrollo de marcadores genéticos de última generación como apoyo al  
mejoramiento genético internacional en teca (*Tectona grandis* L.) y melina  
(*Gmelina arborea* Roxb.)**

Escuela de Ingeniería Forestal

Julio, 2025

## Tabla de Contenido

<b>Título:</b> Desarrollo de marcadores genéticos de última generación como apoyo al mejoramiento genético internacional en teca ( <i>Tectona grandis</i> L.) y en melina ( <i>Gmelina arborea</i> Roxb.).....	1
<b>Código del Proyecto:</b> 1401-133.....	1
<b>Autores</b> .....	1
Resumen .....	2
Introducción .....	3
Marco Teórico .....	6
Metodología.....	9
<i>Objetivo Específico 1:</i> Validar y asegurar el uso comercial de marcadores moleculares SSR, en teca y melina.....	9
<i>Objetivo Específico 2:</i> Determinar la asociación de marcadores SNPs de teca con regiones genómicas de importancia económica. ....	11
<i>Objetivo específico 3:</i> Generar una plataforma para convertir los SNPs (Single Nucleotide Polimorphism) asociados a rasgos de interés económico en marcadores genéticos en teca para uso comercial. ....	12
Resultados.....	15
<i>Objetivo Específico 1:</i> Validar y asegurar el uso comercial de marcadores moleculares SSR (microsatélites) en teca y melina .....	15
<i>Objetivo Específico 2:</i> .Determinar la asociación de marcadores SNPs de teca con regiones genómicas de importancia económica .....	18
<i>Objetivo específico 3.</i> Generar una plataforma para convertir los SNPs (Single Nucleotide Polimorphism) asociados a rasgos de interés económico en marcadores genéticos en teca para uso comercial. ....	21
Discusión .....	31
Objetivo específico 1 .....	31
Objetivo específico 2 .....	32
Objetivo específico 3 .....	33
Conclusiones .....	35
Recomendaciones .....	35
Agradecimientos .....	36
Referencias .....	37
Conferencias virtuales donde se divulgó el proyecto (Webinar y otras).....	42
ANEXOS.....	43

**Título:** Desarrollo de marcadores genéticos de última generación como apoyo al mejoramiento genético internacional en teca (*Tectona grandis* L.) y en melina (*Gmelina arborea* Roxb.)

**Código del Proyecto:** 1401-133

**Autores**

Olman Murillo Gamboa, Escuela de Ingeniería Forestal. Coordinador

Dawa Méndez Álvarez, Escuela de Ingeniería Forestal

Jose Pablo Jiménez Madrigal, DOCINADE

Emanuel Araya Valverde, CENIBIOT/CENAT/CONARE

## Resumen

El proyecto forma parte de una línea de trabajo a largo plazo para el desarrollo de la genómica en especies forestales. El enfoque del estudio fue hacia el desarrollo y refinamiento de marcadores genéticos, tanto de SSR o microsatélites en ambas especies, como de los nuevos SNPs en teca. En un primer objetivo se crearon y validaron Multiplex o grupos de SSR para ambas especies, que permiten genotipar a más bajo costo. Para ambas especies, se logró construir y validar dos Multiplex que agrupan cada uno 5 marcadores SSR. En un segundo objetivo se determinó 13 SNPs de más de 10500, asociados a rasgos de importancia económica en teca. Con una capacidad de predicción temprana superior al 59% en calidad del fuste, crecimiento del DAP y del volumen comercial, así como en más del 40% para la gravedad específica de la madera. Como parte del tercer objetivo, se diseñaron nuevos imprimadores basados en una sola letra (Allele Specific PCR), se enviaron a construir y se validaron con varias muestras independientes de teca. Se crearon nuevos marcadores para los 13 SNPs encontrados, que servirán para el genotipado y evaluación poblacional de la teca. Se recomienda ampliar la base de genotipos secuenciados para el refinamiento y validación de los nuevos marcadores SNPs desarrollados en este proyecto. Es esencial y prioritario el establecimiento de nuevos ensayos genéticos con una mayor base de genotipos de teca y melina, para sustentar la continuidad de trabajo en I + D de la genómica de ambas especies.

Palabras clave: recursos genéticos, genética molecular, forestal, genómica, secuenciación

## Introducción

En Costa Rica, se estima que la teca cuenta con una extensión de aproximadamente 45 000 ha (INEC, 2015), con exportaciones anuales que superan los \$30 millones. Mientras que la melina registra más de 18 000 ha (Censo Nacional Agropecuario y Forestal, INEC 2018, pág 65). Esta especie se ha convertido recientemente, en el motor de la recuperación de la reforestación en Costa Rica, con una demanda en el mercado interno de su madera para tarima, de más de 6,5 millones unidades anuales (ONF 2021).

GENFORES desde su creación en el 2002, logra convertirse en una organización líder a nivel internacional en mejoramiento de la teca y melina, con más de 400 accesiones en cinco países, 9 programas activos en conjunto con empresas y más de 50 ensayos genéticos en campo en la región latinoamericana (Resende, Murillo, Badilla 2019, Badilla & Murillo 2022). El impacto del mejoramiento genético ha sido notorio en la productividad y competitividad del cultivo de estas dos valiosas especies. Los productores y empresas reportan una ganancia genética y aumento del valor de las plantaciones, de 30 a 40% (Resende, Murillo & Badilla 2019; Hernández *et al.* 2021a, Badilla & Murillo 2022). La mayoría de las empresas o inversionistas forestales, se basan hoy día en plantaciones clonales, fenómeno que avanza desde hace más de 10 años en el país (Murillo & Guevara 2013). Ambas especies migran hacia el nuevo desafío, plantaciones monoclonales con un grupo élite de genotipos del más alto rendimiento. Esto progresa en paralelo junto con la segunda generación de mejoramiento genético (F2).

Este tipo de proyectos de corte científico tiene sin embargo su aporte e impacto en el ODS 9, asociado a la industria inclusiva, sostenible, basada en el fomento a la innovación, en específico en la meta 9.5 que habla de aumentar la investigación científica en países en desarrollo. El uso de tecnología molecular avanzada permite al país ser competitivo e innovador en materia de mejoramiento genético. La secuenciación del genoma de especies forestales es un logro muy reciente, disponible en muy pocos países y organizaciones. GENFORES logra alcanzar este alto nivel científico, más es necesario completar el círculo hasta lograr convertir este conocimiento en un uso de valor. Por lo tanto, no basta con los primeros 3 años de investigación, sino que se requiere una visión de más largo plazo y de disciplina de trabajo para lograr alcanzar el alto nivel internacional en esta materia.

En los trabajos previos (“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), se logró avanzar hasta lograr la secuenciación del genoma de la teca y en la primera identificación de los SNPs (última generación de marcadores genéticos). Sin embargo, el tiempo y los recursos no alcanzaron para lograr asociar los más de 10 000 SNPs detectados con los rasgos de relevancia económica, como crecimiento, productividad, calidad de fuste, calidad de la madera, entre otros. Tampoco fue posible su conversión en marcadores genéticos.

En el caso de la melina, se logró recientemente en GENFORES desarrollar 15 nuevos microsatélites, los primeros a nivel internacional para esta especie (Rocha et al 2020). En teca se cuenta ya desde hace buen tiempo con otra colección de al menos 15 microsatélites. Sin embargo, con ninguna de las dos especies se logró la validación y calibración para poder utilizarlos apropiadamente y de forma segura como marcadores genéticos.

Los sistemas de plantación clonal exigen una alta tecnificación y control de la producción. La identidad genética del material en toda la cadena de producción es esencial. En melina es imprescindible garantizar la plantación exclusiva de genotipos tolerantes a la marchitez y muerte temprana causada por el hongo *Ceratocystis fimbriata* (Méndez et al., 2001, Méndez et al., 2023). En teca se ha identificado recientemente, genotipos cuyo color particular de duramen será un criterio que discrimine el precio en los mercados internacionales (Molina 2017). Para lo cual, es esencial tener una herramienta que asegure la identificación genética de los materiales que se llevan a campo. Así como la realización de análisis de parentesco en las poblaciones. Información esencial para los trabajos de cruces controlados y la mantención de una diversidad genética mínima.

El desafío mayor es como garantizar la identidad genotípica de las colecciones clonales de las empresas en sus invernaderos, así como del material que se planta a nivel operativo. Pero la situación de más apremio se está presentando con la F2 o segunda generación de mejoramiento, en la que GENFORES está inmersa, donde se requiere de cruces controlados entre los genotipos élite. La progenie F2 (la semilla) necesariamente seguirá la segregación mendeliana, es decir un 75% no serán deseables (Figura 1), y no será posible su identificación en este estadio.

	Paterno Alta Productividad (AA)	Paterno Baja Productividad (aa)
Materno Alta Productividad (AA)	Progenie 100% <b>AA</b>	Progenie 100% <b>Aa</b>
Materno Baja Productividad (aa)	100% <b>aA</b>	100% <b>aa</b>

Figura 1: segregación mendeliana del cruce de dos progenitores heterocigotas

Con el reciente desarrollo de la secuenciación genética de teca en GENFORES, se logró identificar SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), considerados como la última generación de marcadores genéticos. Con los cuales existe la posibilidad de asociarlos con rasgos de interés como tolerancia a la sequía, color del duramen de la madera, mayor productividad, tolerancia a enfermedades, entre otros. De manera que uno de los objetivos principales es convertir los SNPs en nuevos marcadores genéticos, que permitan conocer el genotipo de la progenie desde el estadio de plántulas en un invernadero. Con esto se podría acortar en tiempo y en costos los ensayos de campo.

Por tanto, el proyecto tuvo como objetivo general “Desarrollar marcadores SNP y optimizar marcadores genéticos SSR para teca (*Tectona grandis* L.) y melina (*Gmelina arborea* Roxb.) para fortalecer programas de mejoramiento genético”.

Puede concluirse entonces, que el avance hacia una silvicultura clonal de mayor productividad, mayor valor, de mayor impacto, solamente podrá ser posible si logramos en paralelo, el desarrollo de herramientas tecnológicas como los marcadores genéticos.

## Marco Teórico

Con el desarrollo de la cooperativa de mejoramiento GENFORES, como modelo de vinculación TEC con empresas forestales en 5 países, ha sido posible estos avances continuos en ya más de 20 años de investigación básica y aplicada. Los resultados están a la vista, nos respaldan más de 70 publicaciones científicas, más de 60 tesis de grado, maestría y doctorado, más de 36 empleos directos generados para nuestros egresados, e ingresos en FUNDATEC de más de \$50 000 anuales.

Del periodo 2019 -2021, GENFORES logra alcanzar madurez internacional al lograr tres importantes eventos: **1)** la secuenciación de la teca, en cooperación con la Universidad Estatal de Carolina del Norte (USA), donde se logra identificar los primeros SNPs a nivel internacional (marcadores genéticos de última generación); **2)** se logra la identificación correcta del patógeno causante de la marchitez y muerte temprana de la melina (Méndez *et al.* 2019; 2020), que ha permitido el inicio de la selección de genotipos tolerantes (Méndez *et al.* 2022); trabajos realizados con una fuerte cooperación con la Universidad Federal de Viçosa, Brasil); **3)** inicio de los cruzamientos controlados en ambas especies, para el avance hacia la 2da generación de mejoramiento (F2) (Hine *et al.* 2019, Hine *et al.* 2020, Badilla & Murillo, en prensa); **4)** se logró en GENFORES desarrollar 15 nuevos microsatélites, los primeros a nivel internacional para esta especie (Rocha *et al.* 2020). Estos avances han sido posibles gracias al apoyo de la VIE, del CIF de la Escuela de Ing. Forestal y de las empresas miembro de GENFORES. Que han permitido mantener al TEC a la vanguardia internacional en mejoramiento genético de ambas especies.

Sin embargo, el tiempo y los recursos no dieron para lograr asociar los más de 10 000 SNPs detectados con los rasgos de relevancia económica, como crecimiento, productividad, calidad de fuste, calidad de la madera, entre otros. Tampoco fue posible su conversión en marcadores genéticos. En el caso de los microsatélites, con ninguna de las dos especies se logró completar la validación y calibración para poderlos utilizar apropiadamente y de forma segura como marcadores genéticos.

En relación con la selección del mejor material genético para plantar a escala comercial, GENFORES ha acelerado el establecimiento y evaluación de ensayos genéticos en sitios estratégicos. Los productores y empresas reportan una ganancia genética y aumento del valor de las plantaciones, de 30 a 40% (Badilla & Murillo 2017, Resende, Murillo & Badilla 2019; Hernández *et al.* 2021a, Badilla & Murillo 2022). Que han permitido que la mayoría de las empresas o inversionistas forestales desarrollen una silvicultura clonal, corriente que

avanza desde hace más de 10 años en el país (Murillo & Guevara 2013, Molina *et al.* 2019, Hernández *et al.* 2021c). En estos momentos ambas especies migran hacia un nuevo salto tecnológico, plantaciones monoclonales con base en un grupo élite de genotipos del más alto rendimiento (Hernández *et al.* 2021b, Badilla & Murillo 2022). Este esfuerzo ha permitido optimizar la selección de clones de ambas especies, apropiados para plantar en regiones secas (Pacífico Norte), regiones muy húmedas (Pacífico sur y Zona norte) y regiones pluviales como el Caribe (Hernández *et al.* 2021c, Molina *et al.* 2019, Badilla & Murillo 2022).

La genética molecular y los marcadores genéticos tienen poco sentido si no se basan en programas sólidos de mejoramiento genético. No basta con el avance tecnológico *per se*, sin tener claro cuál material se propaga comercialmente y ¿por qué? La F2 y las generaciones de mejoramiento, deben basarse en cruces controlados con el material élite, que ha sido seleccionados por su valor genético en un ranking. Que, a su vez, ha sido obtenido de una red robusta de ensayos genéticos de campo. La genética molecular debe entenderse como de apoyo y para facilitar el avance en el mejoramiento y producción comercial de plantas.

Los genetistas continúan haciendo esfuerzos para algún día, migrar hacia la selección genómica, que permita el ahorro en tiempo y recursos en costosos ensayos de campo que requieren de al menos 5 años de observación (Grattapaglia & Resende 2011, Zhao *et al.* 2019, Dunker *et al.* 2019. Jiménez *et al.* 2021). El genoma de teca se secuenció hace pocos años (Thogthawee y Volkaert 2014, Zhao *et al.* 2019) y se han realizado diferentes análisis de transcriptoma y proteoma (Diningrat *et al.* 2014; Galeano *et al.* 2015; Quiala *et al.* 2012), pero ha sido a nivel descriptivo. Con la secuenciación, es posible determinar la presencia de SNPs, que básicamente logran identificar variantes a nivel de un solo nucleótido. Su enorme ventaja está en que permite detectar cientos y hasta miles de sitios específicos del genoma donde poder inspeccionar o “leer” el código genético. Con estos marcadores SNPs se han venido desarrollando trabajos de mejoramiento genético asistido con marcadores moleculares, técnica que se ha utilizado con eucaliptos en Brasil y se le ha denominado Selección Genómica Amplia (Gratapaglia y Kirst 2008, Gratapaglia y Resende 2011). Los primeros SNPs fueron recientemente reportados para teca por Win y Goto (2016) de la secuenciación del cloroplasto (cpSNP) y más recientemente, por el grupo de Dunker *et al.* (2019). Sin embargo, en ambos casos provienen de muestras pequeñas de árboles sin

ninguna perspectiva de utilización, o de bosque natural en Nyamar, y sin vinculación con programas de mejoramiento genético.

GENFORES logró identificar recientemente un número considerable de SNPs en sus colecciones de mejoramiento genético de teca, gracias a la colaboración con la Universidad Estatal de Carolina del Norte. Se trabaja en estos momentos en su asociación con rasgos de importancia económica, como tasa de crecimiento, densidad y color de la madera, entre otros.

## Metodología

### **Objetivo Específico 1: Validar y asegurar el uso comercial de marcadores moleculares SSR, en teca y melina**

*Localización del área de estudio:* La investigación se realizó en el Laboratorio de Genética Molecular Forestal (Centro de Investigación en Innovación Forestal, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago) y en los invernaderos de la Escuela de Ing. Forestal en el Campus Tecnológico en San Carlos.

*Aislamiento de ADN:* se seleccionaron al azar 20 genotipos de teca y 20 de melina de las colecciones de GENFORES existentes en los invernaderos forestales (Campus Tecnológico San Carlos), de los cuales se cortó una sección de hoja joven de 10x10 cm, la cual se colocó dentro de un tubo cónico que contiene sílica desecante para evitar la degradación de la muestra y a la vez permitir su conservación. En el laboratorio se pesó 50 mg de la muestra y se le extrajo el ADN mediante un método basado en CTAB, tal y como se describe en Araya-Valverde *et al.* (2019). La cantidad y pureza del ADN se determinó mediante espectrofotometría con mediciones a 260 y 280 nm y su integridad del ADN se visualizó en un gel de agarosa.

*PCR multiplex de marcadores microsatélites:* esta etapa consistió en obtener la menor cantidad posible de reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) para la totalidad de marcadores microsatélites. De este modo, si para una muestra de ADN (un genotipo) se hace el genotipado con 10 microsatélites, mediante PCR convencional se deben hacer 10 PCRs por separado. Mientras que con el PCR multiplex se pudo reducir a solamente 2 o 3 PCRs. Esto implicó ahorro de reactivos, consumibles y tiempo de operación. En el caso de teca, se usó como referencia los microsatélites desarrollados por Verhaegen *et al.* (2005) y para melina los microsatélites desarrollados por Rocha *et al.* (2020). El imprimador "forward" de cada uno de estos microsatélites se marcó con algunos de los fluoróforos FAM, VIC, NED o PET, según el tamaño de alelos esperados para así formar los grupos de PCR multiplex.

La estrategia para desarrollar los PCR multiplex fue la misma para ambas especies. En primer lugar, se realizó la PCR para cada uno de los microsatélites por separado (PCR convencional), proveniente de dos orígenes de ADN. Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis capilar acoplada con fluorescencia en el analizador genético

SeqStudio (Applied Biosystems, USA). El tamaño de los alelos se determinó usando como referencia el marcador de peso molecular interno LIZ600. Con este resultado se procedió con la PCR multiplex donde se espera que para ambas especies sean 3 PCR's y como máximo 4 PCR's para evitar su traslape en un mismo zimograma. Para cada PCR multiplex se agregaron los mismos componentes de una PCR convencional (buffer de PCR, dNTPs, MgCl<sub>2</sub>, Taq polimerasa) y se usaron aditivos que mejoraron la eficiencia de la PCR, tales como BSA (albúmina de suero bovino) y DMSO (dimetilsulfóxido). En esta etapa se agregaron los imprimadores "forward" y "reverse" de al menos 4 a 5 microsatélites diferentes en una misma reacción de PCR; cada uno de los imprimadores se agregó en la misma concentración de 0,2 uM. La visualización también se realizó mediante el SeqStudio y los resultados se analizaron con el software GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems, USA). Los parámetros por evaluar fueron: verificar si cada microsatélite amplificó, número de alelos observados, unidades relativas fluorescentes de cada microsatélite para ver la intensidad de las señales de los alelos, traslape de alelos entre microsatélites, señales que dificulten la interpretación tales como "stutters" (tartamudeo). Si alguno de estos parámetros no permitió la correcta interpretación de los alelos, entonces se procedió a correr una nueva ronda de PCR multiplex, en la cual se ajustó la concentración de los imprimadores (se reduce o se aumenta). Se realizaron de 4 a 6 rondas de optimización hasta que la interpretación de los alelos fue la apropiada para el genotipado. Una vez optimizadas las concentraciones de imprimadores en la PCR multiplex, se procedió a optimizar la temperatura de alineamiento, Todas las pruebas iniciales se realizaron a 55°C, pero en la optimización se evaluaron las temperaturas de 57, 59 y 61°C.

Una vez optimizada las PCR multiplex, se procedió a realizar el genotipado de 98 clones de teca y 100 de melina, usando las condiciones de reacción optimizadas para la concentración de cada imprimador en la PCR multiplex y la temperatura de alineamiento. De nuevo, la visualización se realizó en el SeqStudio y los resultados se analizaron con GeneMapper v4.0. En este software se determinó los tamaños de los alelos y se generó la tabla de genotipado, la cual se usó posteriormente para la determinación de pureza clonal, análisis de parentesco y diversidad. Se utilizó la estrategia seguida por Rocha *et al.* (2020) para este tipo de análisis apoyándose en programas como GenAlex y paquetes de R como *adegenet*, *poppr*, *ade4*.

Con la tabla de genotipado estandarizada para cada especie, se determinó la pureza clonal, el parentesco y diversidad a una muestra (98 clones de teca y 100 clones de melina),

colectados de los minijardines clonales de GENFORES en Santa Clara, San Carlos. Se realizó la extracción de ADN, se corrió el PCR multiplex y el análisis de fragmentos siguiendo el procedimiento mencionado anteriormente.

### ***Objetivo Específico 2: Determinar la asociación de marcadores SNPs de teca con regiones genómicas de importancia económica.***

*Localización del área de estudio:* La investigación se realizó en el Laboratorio de genética molecular forestal (Centro de Investigación en Innovación Forestal, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago).

*Tabla de genotipado de SNPs y datos fenotípicos:* en el proyecto “Desarrollo de recursos genómicos en *Tectona grandis*. Fase II, Secuenciación del genoma y búsqueda de marcadores SNPs para su utilización en mejoramiento genético” se secuenciaron 33 líneas clonales de teca de alto rendimiento de la colección de germoplasma de GENFORES mediante la herramienta de genotipado por secuenciación (GBS). Las secuencias se analizaron en el software STACKS (Catchen et al. 2011), lo cual generó como resultado los archivos .vcf (variants call file) que contienen los SNPs dentro de cada genotipo y los polimorfismos de los SNPs entre las 33 líneas clonales. Este archivo vcf se usará para seleccionar las variantes SNPs con mejor porcentaje de asignación con ayuda del software Stacks (Catchen *et al.* 2011) y también para generar la tabla de genotipado. Esta tabla contiene los nombres de las líneas clonales en las filas y las variantes SNPs en las columnas. Por otro lado, se revisaron y se validaron los datos adquiridos en GENFORES para los rasgos de crecimiento, resistencia a patógenos y color del duramen de estas 33 líneas clonales usadas en la secuenciación por GBS. La estructura de los datos fenotípicos concatenados para estos rasgos se generó en Excel y se siguió la misma estructura que tiene la tabla de genotipado.

*Búsqueda de asociaciones de SNPs con datos fenotípicos:* una vez generadas las tablas de genotipado y de datos fenotípicos, se emplearon herramientas de GWAS (genoma wide association studies), que buscaron la asociación de variantes genéticas como los SNPs con rasgos fenotípicos. Se utilizaron al menos dos estrategias de análisis para validar la asociación de los SNPs con los rasgos fenotípicos, En una de estas se usó programas especializados como SELEGEN (Resende 2007) para ajustar los datos fenotípicos con la opción REML-BLUP y se siguió la estrategia sugerida por Resende *et al.* (2018) en la que también se incluyó la matriz de identidad y la matriz de parentesco siguiendo el modelo:

$$y^* = X\beta + Zu + m_i + \varepsilon$$

donde  $\beta$  es el efecto fijo del intercepto o media general;  $u$  es el efecto aleatorio aditivo de genotipo/variedad;  $m_i$  se refiere al efecto fijo del  $i$ -ésimo SNP; y  $\varepsilon$  son los efectos residuales del modelo.

En la segunda estrategia se usó el programa Tassel (Brabury et al. 2007) donde se valoraron las opciones de modelos lineales generales y modelos lineales mixtos para detectar asociaciones significativas ( $p < 0.05$ ). En la estrategia con Tassel se incluye la matriz de parentesco generada en el programa Structure (Pritchard et al. 2000) como factor de corrección de la estructura de las líneas clonales para evitar las asociaciones espurias. Tassel emplea un modelo denotado por  $y = Xb + Zu + e$ , donde  $y$  es el vector de observaciones;  $b$  es un vector desconocido que contiene efectos fijos que incluyen los SNPs y la estructura de la población ( $Q$ );  $u$  es un vector desconocido de efectos genéticos aditivos aleatorios rasgos fenotípicos para individuos o líneas;  $X$  y  $Z$  son las matrices de diseño conocidas; y  $e$  es el vector no observado de residuos aleatorios. Cada alelo del SNP se ajustó como una clase separada y los heterocigotos se ajustaron como clases de marcadores adicionales.

### **Objetivo específico 3: Generar una plataforma para convertir los SNPs (Single Nucleotide Polimorphism) asociados a rasgos de interés económico en marcadores genéticos en teca para uso comercial.**

*Diseño de imprimadores de SNPs asociados a rasgos fenotípicos para validación mediante secuenciación Sanger:* se revisaron las secuencias flanqueantes de los SNPs seleccionados en el objetivo 2 que estuvieran asociadas a los rasgos fenotípicos de interés. Estos SNPs deben tener al menos 100 pares de bases de ADN corriente arriba y corriente abajo para el diseño de imprimadores. En caso de no tenerlas, se mapea el SNP con el genoma de referencia de teca obtenido en el proyecto “Desarrollo de recursos genómicos en *Tectona grandis*. Fase II, Secuenciación del genoma y búsqueda de marcadores SNPs para su utilización en mejoramiento genético”. Se diseñaron imprimadores con la herramienta PrimerBlast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para amplificar por PCR las regiones del genoma de teca donde se ubican los SNPs. Se optimizaron los parámetros de la PCR (temperatura de alineamiento y concentración de imprimadores) para obtener productos de PCR de un solo amplicón. Se determinó la secuencia de nucleótidos de estos amplicones mediante la reacción de secuenciación Sanger, con base en el kit

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit V3.1 (Applied Biosystems, USA), que utiliza la tecnología de ddNTPs marcados con fluoróforos. La determinación de la secuencia se realizó en el analizador genético SeqStudio (Applied Biosystems, USA) y con la ayuda del programa Sequencing Analysis Software v6.0 (Applied Biosystems, USA).

*Evaluación de dos plataformas de genotipado de los SNPs:* el siguiente paso lógico después de validar las variantes por secuenciación fue la detección rápida de los SNPs en conjuntos de muestras más amplios. Con miras a lograr esto, se evaluaron dos plataformas de detección de SNPs que utilizan la tecnología de PCR en tiempo real. Uno de los métodos se denomina HRM (High Resolution Melting) que consiste en la comparación de curvas de fusión de las hebras de ADN, las cuales difieren en su composición de nucleótidos. Tal y como se espera con los SNPs, donde habrá genotipos que son homocigotas para alguna de las alternativas de los alelos o heterocigotas. Para realizar HRM, se propuso primero el diseño de imprimadores en la región que flanquea el SNP. Usando la herramienta PrimerBlast, se buscó imprimadores con alta temperatura de fusión para asegurar la especificidad y que además generara amplicones con un tamaño máximo de 150 pares de bases. Las PCRs para HRM se prepararon con el reactivo MeltDoctor HRM Master Mix (Applied Biosystems, USA) y las corridas de la PCR se hicieron en un termociclador para PCR en tiempo real QuantStudio3 (Applied Biosystems, USA). Se usará el QuantStudio Design and Analysis Software para la interpretación de los resultados de las curvas de disociación, para identificar los individuos homocigotas y heterocigotas cuyas variantes fueron previamente validadas con secuenciación Sanger. Sin embargo, el desarrollo de los HRM no se logró debido a que se dañó el equipo donde realizar estas electroforesis en el CENIBIOT, desde el 2024 y no se pudo reparar por su alto costo.

La segunda plataforma por evaluar utiliza sondas de hibridación TaqMan (Applied Biosystems, USA), las cuales utilizan imprimadores y sondas marcadas con fluoróforos y un “quencher” (apagador), teniendo como referencia pasiva el fluoróforo ROX. Se diseñaron imprimadores con la herramienta PrimerQuest™ Tool (<https://www.idtdna.com/pages/tools/primerquest>) para cada SNP. Para la especificidad en la detección de los alelos del ensayo TaqMan, se diseñaron dos sondas, una marcada con el fluoróforo FAM (para detectar una variante homocigota) y la otra con el fluoróforo VIC (para detectar la otra variante alélica). Las reacciones de PCR se prepararon con el TaqMan Real-Time PCR Master Mix y se corrieron en el equipo QuantStudio3. Los dos fluoróforos

se detectaron con fuentes de excitación y filtros de emisión en las respectivas longitudes de onda de FAM y VIC.

*Validación de SNPs en colecciones de teca:* Se utilizaron muestras de ADN de la misma colección clonal de teca que fue previamente secuenciada. Se determinó la presencia de los SNP's asociados a cada uno de los rasgos de interés (mayor peso específico, mayor DAP, mayor Volumen Comercial, Rectitud de fuste y color de duramen) en cada uno de los 33 genotipos que se utilizaron en la secuenciación.

Una de las limitantes más importantes del desarrollo de este proyecto es que se logró secuenciar solamente 33 genotipos. El proyecto pretende continuar en futuras versiones con un refinamiento de todo el trabajo genómico en teca, así como iniciar uno completo con melina. Para esto se realizaron las siguientes actividades en el marco de este proyecto:

1. Se estableció en campo nuevos ensayos genéticos con teca, con al menos 100 genotipos.
2. Se escribió una propuesta nueva para secuenciar y desarrollar la genómica con melina, mediante la cooperación con la Universidad de Göttingen, Alemania.
3. Se estableció en campo (Zona Norte de Costa Rica) un ensayo clonal de melina con 98 genotipos y 4 plantas de segunda generación de mejoramiento (F2), que en agosto 2025 cumplirá 2 años. Esta será la base para continuar con los trabajos a futuro de genómica con esta importante especie.

## Resultados

### **Objetivo Específico 1: Validar y asegurar el uso comercial de marcadores moleculares SSR (microsatélites) en teca y melina**

De manera general, se siguió un plan estratégico con una especie a la vez. Con teca se logró completar el desarrollo de los dos multiplex basados en dos grupos de cinco marcadores cada uno. Con esto se logra utilizar estos marcadores con mucho menos corridas de electroforesis y de uso de reactivos. Se aumentó la muestra de teca para poder abarcar las colecciones de varias empresas del país, alcanzando un total de 94 clones genotipados.

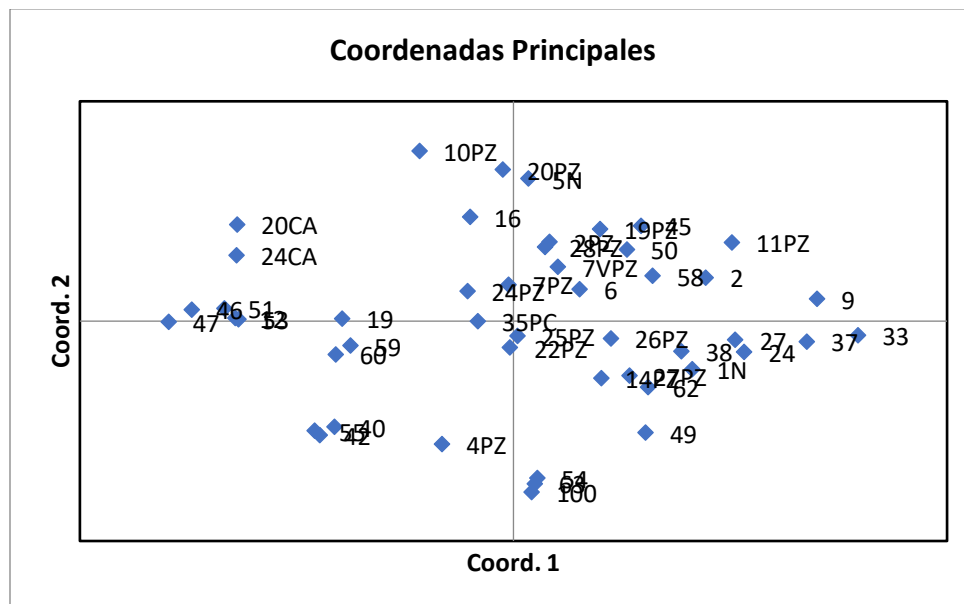
Parte de los resultados con teca de este objetivo fueron publicados en el artículo “Méndez *et al.* 2025. En el Cuadro 1 se muestra el resultado de la validación de los multiplex, con base en la progenie de cruces controlados de teca.

**Cuadro 1.** Análisis de Chi-cuadrado para determinar la consistencia en el genotipado de progenies de hermanos completos de teca.

SSR	Progenit. 1	Progenit. 2	Genotipado de progenies		Observ.	Esperado	$\chi^2$	Valor de P
SSR10	219	219	219	219	7	10	1,8 ns	0,180
	219	229	219	229	13	10		
SSR11.2	128	138	128	130	10	10	0	
	130	130	130	138	10	10		
SSR12	207	207	205	207	8	10	0,8	0,371
	205	207	207	207	12	10		
SSR13	258	260	256	258	5	5	1,2	0,753
			256	260	3	5		
	256	258	258	258	6	5		
			258	260	6	5		
SSR14.2	300	308	296	300	7	5	4,8	0,187
			296	308	1	5		
	296	298	298	300	5	5		
			298	308	7	5		
SSR15	171	189	171	185	10	5	6,8	0,079
			171	187	4	5		
	185	187	185	189	3	5		
			187	189	3	5		

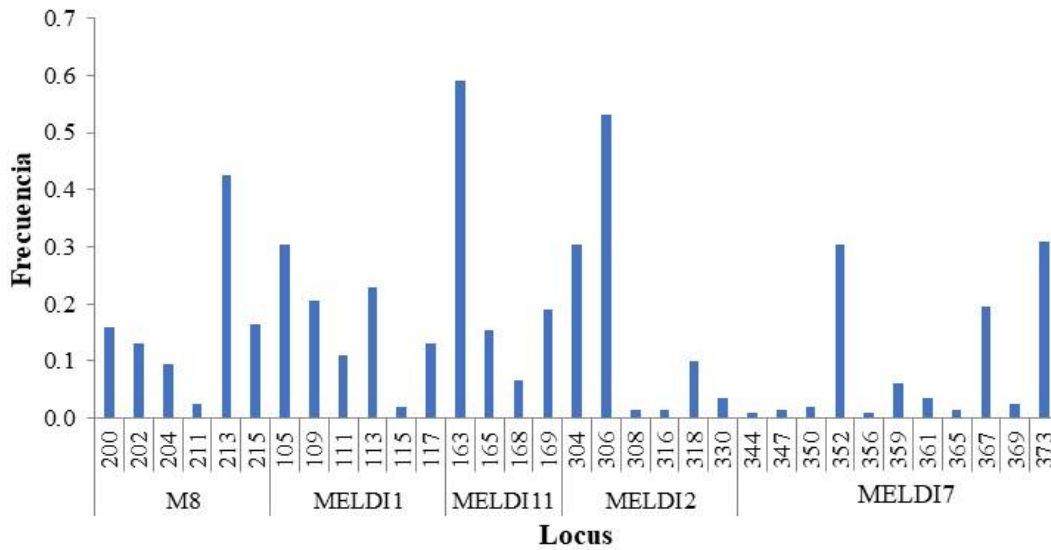
SSR2	127	127	123	127	10	10	0	NA
	123	127	127	127	10	10		
SSR9	188	188	188	188	13	10	1,8	0,180
	188	194	188	194	7	10		

En el caso de la melina se desarrolló una tesis de licenciatura de la EIFO (Escuela de Ing. Forestal) que completó el análisis de validación y desarrollo de multiplex con base en 100 clones del programa de mejoramiento genético de GENFORES, en el trabajo titulado “Validación de protocolo de PCR Multiplex con microsatélites para melina (*Gmelina arborea* Roxb.)”. Como parte de los resultados se lograron construir dos PCR multiplex basado en cinco marcadores SSR cada uno. Con este procedimiento se logra analizar en un mismo corrido de electroforesis cinco marcadores con todo su polimorfismo. Mediante el uso del software GenAlex se registró en esta amplia muestra, una tasa de heterogocidad observada y esperada de 0,67 y 0,71 respectivamente, con una tasa de exclusión superior al 0,999.



**Figura 1.** Análisis de Coordenadas principales (PCoA) de 48 genotipos únicos de *Gmelina arborea* por multilocus, programa de mejoramiento genético de GENFORES en Costa Rica (García, 2024).

Se determinó una alta consanguinidad genética en la población de melina de GENFORES en Costa Rica con un valor promedio del 37% de ADN compartido entre los genotipos.



**Figura 2.** Frecuencia alélica para la combinación de cinco microsatélites del PCR multiplex 1 de *Gmelina arborea* (García, 2024).

Como se observa en el Cuadro 2, según los parámetros genéticos para la colección global de melina se encontró que el número de alelos diferentes ( $N_a$ ) por locus (microsatélite) fue de siete. Donde el microsatélite MELDI7-apareció con 11 como la mayor cantidad de alelos diferentes. El locus con menor número de alelos fue MELDI11 con cuatro alelos.

La heterocigosidad observada registró como valor máximo 0,87 en el locus M5, mientras que el valor mínimo de heterocigosidad observada fue de 0,54 en el microsatélite MELDI24.

**Cuadro 2.** Parámetros genéticos de 10 microsatélites validados en la colección de 100 genotipos de *Gmelina arborea* de GENFORES, Costa Rica.

Locus	$N_a$	$N_e$	PIC	$H_o$	$H_e$	$uH_e$	R (pb)	PE1	PE2	PE3	V
<b>M5</b>	8	5,45	0,79	0,87	0,82	0,82	103-130	0,64	0,46	0,81	4,82
<b>M8</b>	6	3,85	0,71	0,61	0,74	0,74	200-215	0,53	0,35	0,72	4,14
<b>MELDI1</b>	6	4,60	0,75	0,67	0,78	0,79	105-117	0,57	0,39	0,76	4,44
<b>MELDI11</b>	4	2,42	0,54	0,56	0,59	0,59	163-169	0,35	0,19	0,52	2,24
<b>MELDI17</b>	8	5,40	0,79	0,78	0,81	0,82	142-158	0,64	0,46	0,82	5,55
<b>MELDI2</b>	6	2,59	0,55	0,60	0,61	0,62	304-330	0,36	0,21	0,53	2,34

<b>MELDI21</b>	6	3,11	0,62	0,55	0,68	0,68	225-261	0,42	0,26	0,60	3,24
<b>MELDI24</b>	9	2,78	0,58	0,54	0,64	0,64	209-235	0,39	0,23	0,57	3,04
<b>MELDI6</b>	5	3,01	0,63	0,72	0,67	0,67	297-307	0,44	0,26	0,63	2,70
<b>MELDI7</b>	11	4,28	0,73	0,84	0,77	0,77	344-373	0,56	0,38	0,74	5,19
<b>Promedio</b>	7	3,75	0,67	0,67	0,71	0,71	103-373	0,49	0,32	0,67	3,77

Número de alelos (Na). Alelos efectivos (Ne). Contenido de información polimórfica (PIC). Heterocigosidad observada (Ho). Heterocigosidad esperada (He). Heterocigosidad insesgada esperada (uHe). Rango de alelos en pares de bases (R). PE poder de exclusión (discriminación) cuando se conocen los genotipos de ambos padres (PE1). PE cuando se conocen los genotipos de un solo padre (PE2). PE al excluir a dos padres putativos (PE3). Diversidad genética (V).

### **Objetivo Específico 2: .Determinar la asociación de marcadores SNPs de teca con regiones genómicas de importancia económica**

Para este objetivo el proyecto logró cumplir con todo lo planeado, tal y como se puede revisar en la publicación científica “Callister, A.; Jiménez-Madrigal, J.P.; Whetten, R.; Murillo, O. 2024. **Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones.** *Silvae Genetica* 73:13–23. <https://doi.org/10.2478/sg-2024-0002>”, así como en la ponencia presentada en el Congreso Mundial de IUFRO en Suecia “Callister, A., Murillo, O., Jiménez, J.P. 2024. **The future is genomic: rapid clone selection for teak productivity and value.** *In: XXVI IUFRO World Congress 2024. FORESTS AND SOCIETY TOWARDS 2050. Strengthening Teak Forest Management for Sustainable Teakwood Supply Chains and Trade. Stockholm, Sweden; 23-29 June 2024.*”, así como en varias presentaciones, Webinar y otras ponencias presentadas en congresos, cursos y simposios internacionales.

Tal y como se propuso en este objetivo, en el Cuadro 3 se muestra los SNPs (variantes de un solo nucleótido) determinados como asociados significativamente con 7 rasgos de importancia económica en teca. Puede observarse que se encontraron más de 40 variantes en total, directamente asociados a rasgos como volumen comercial, DAP, densidad de la madera, entre otros, como producto de los trabajos de secuenciación del genoma de la especie.

**Cuadro 3.** SNPs asociados a rasgos de importancia económica en teca (*Tectona grandis* L.) en Costa Rica (Callister *et al.* 2024).

Rasgo	MAF	Efecto	SE(Efecto)	Valor "P"	Colinealidad
<b>Calidad del fuste</b>					
CHR_03.14422001.GA	0,12	3,79	0,81	1,16E-04	Independiente
CHR_03.15369675.TA	0,10	3,96	0,91	2,46E-04	significantly 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
<b>Volumen comercial</b>					
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	Independiente
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
<b>DAP</b>					
CHR_01.15809500.GT	0,23	0,75	0,17	2,86E-04	Independiente
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	Independiente
CHR_17.11930769.AC	0,48	-0,74	0,16	1,90E-04	significantly collinear
<b>Gravedad Específica</b>					
CHR_01.17266971.AG	0,15	-0,025	0,005	6,69E-05	Independiente
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	Independiente
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
<b>Color A del duramen</b>					
CHR_01.17606298.TA	0,31	0,68	0,16	4,91E-04	Independiente
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	Independiente
CHR_15.12614645.AC	0,23	-1,32	0,31	3,94E-04	significantly collinear
<b>Color C del duramen</b>					
CHR_10.4047519.TC	0,13	0,92	0,22	3,94E-04	NA

Marcadores completamente redundantes se incluyen dentro de completamente colineales con algún otro marcador independiente ( $p > 0,01$ ).

Puede observarse del Cuadro 3, que se registraron al menos uno o dos SNPs significativamente asociados para cada uno de los rasgos de mayor importancia económica de la especie.

Es importante señalar que no solo se logró determinar más de 40 SNPs (de un total de más de 10 500) asociados con rasgos de importancia económica (Cuadro 3), como fue establecido al inicio del proyecto. Sino que se avanzó un paso más para determinar la posibilidad de predicción a edad temprana en plantas juveniles, la presencia de alelos favorables como se muestra en el cuadro 4.

**Cuadro 4.** Probabilidad de predicción temprana en plantas juveniles, la presencia de alelos favorables (SNPs) asociados con rasgos de importancia económica en teca (*Tectona grandis* L.) en Costa Rica (Callister *et al.* 2024).

	Probabilidad o capacidad de predicción temprana según el modelo bayesiano empleado					
Rasgo	BayesA	BayesB	BayesC	BayesLasso	BRR	Número de SNPs
Calidad	0,40	0,40	0,39	0,37	<b>0,40</b>	<b>3</b>
Volumen Comercial	0,60	0,59	0,57	0,58	<b>0,60</b>	<b>3</b>
DAP	0,65	0,64	0,66	0,56	<b>0,66</b>	<b>3</b>
Gravedad Específica	0,58	0,57	0,58	0,51	<b>0,59</b>	<b>2</b>
Duramen%	0,38	0,40	0,39	0,38	<b>0,40</b>	<b>2</b>
Color del duramen (A)	-0,46	-0,51	-0,51	-0,49	-0,51	0
Color del duramen (B)	-0,03	-0,03	-0,12	-0,22	-0,08	0
Color del duramen (C)	-0,13	-0,09	-0,14	-0,16	-0,11	4

Puede observarse que para los rasgos Volumen Comercial, DAP y gravedad específica de la madera se identificaron y registraron valores relativamente altos de predicción (> 59%),

a pesar de que el estudio solamente secuenció 33 genotipos. La proporción de duramen aparece con una precisión del 40%, sin embargo, este rasgo es complejo de analizar puesto que su magnitud continúa aumentando con la edad. Por lo que no se vislumbra como un rasgo económico de utilidad inmediata. Los SNPs no lograron una buena asociación con ninguno de los tres criterios de color del duramen (desde muy claros hasta muy oscuros), por lo que se deberá retomar estos rasgos en futuras investigaciones.

**Objetivo específico 3. Generar una plataforma para convertir los SNPs (Single Nucleotide Polimorphism) asociados a rasgos de interés económico en marcadores genéticos en teca para uso comercial.**

Se desarrollaron imprimadores para teca tomando los dos mejores SNPs asociados a cada uno de los rasgos de interés (10 en total, ver Cuadro 4). Estos imprimadores se diseñaron para utilizar en tres plataformas de detección de SNPs, secuenciación Sanger, HRM (*High Resolution Melting*) y AS-PCR (Allele Specific PCR) (Cuadro 5.).

**Cuadro 5.** Secuencias de imprimadores según plataforma a utilizar y por rasgo de interés desarrollados para *Tectona grandis*.

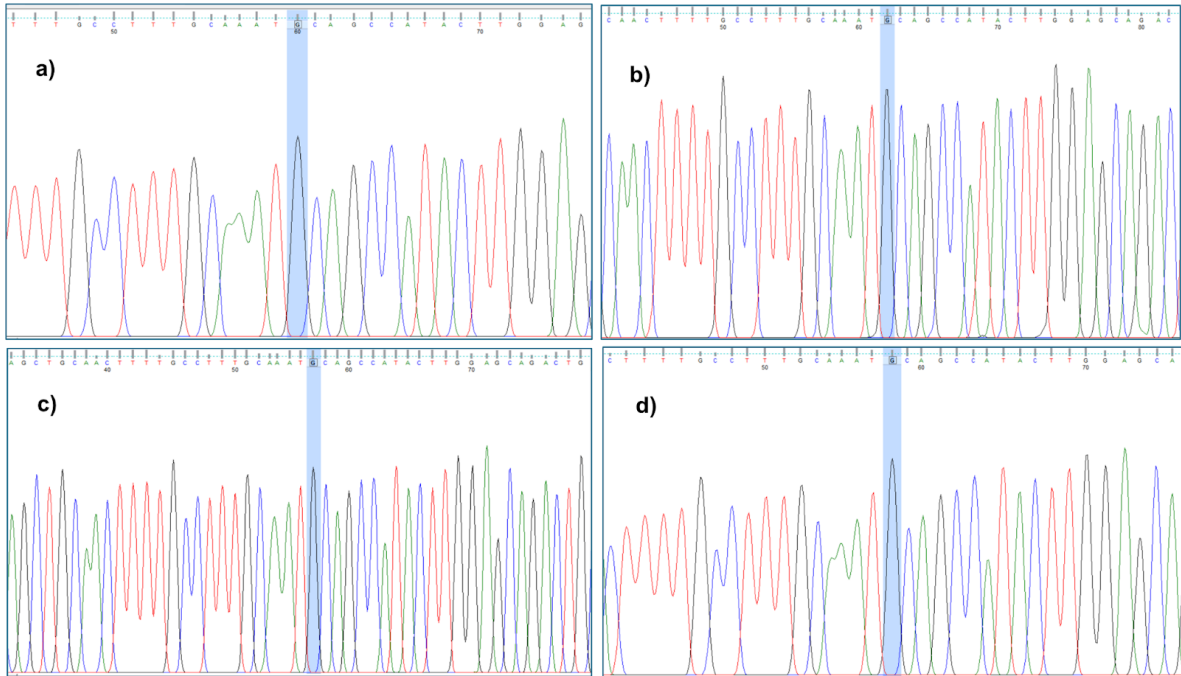
Marcador	Plataforma	Imprimador	Secuencia (5' - 3')
TQS_C_CHR_07.7671436.AG	HRM	TQS_1_HRM_F	ACTATGTAAATTGTGCAGGTCAAA
	HRM	TQS_1_HRM_R	TCCTCTGGAGTGGCTTTCAT
TQS_C_CHR_19.431712.TC	HRM	TQS_2_HRM_F	CCACCAAGTGGGCAACATATC
	HRM	TQS_2_HRM_R	GCAGTCCTACAGAGACCAGA
V_I_CHR_07.4556893.AG	HRM	V_1_HRM_F	GCCTAATGAAAGAGGAACCGGA
	HRM	V_1_HRM_R	AGGCACTTGTATGGTCATTGGA
V_C_CHR_06.12288128.GA	HRM	V_2_HRM_F	AACCAACCGGTCTGATCTGG
	HRM	V_2_HRM_R	GGACCTAGAAAAATTCGGTCGT
DBH_I_CHR_01.15809500.GT	HRM	DBH_1_HRM_F	CCGGAGTCGCTGTTTCTGT
	HRM	DBH_1_HRM_R	ATTGATAGGGCGTTGGGGC
DBH_C_CHR_04.2520866.CT	HRM	DBH_2_HRM_F	GCTTGGTGACTIONCCTGAAAGA

	HRM	DBH_2_HRM_R	CCGGCCACTCAGAGAACTAA
SG_I_CHR_01.17266971.AG	HRM	SG_1_HRM_F	TGTCATTACAACCGGCACAAAG
	HRM	SG_1_HRM_R	CGGCTGATTGAACATGCACC
SG_I_CHR_05.4640519.GA	HRM	SG_2_HRM_F	GATTGGGTAAAGGCCTAGCGA
	HRM	SG_2_HRM_R	CTGCATACCTGGTGGAAAGGC
HCA_I_CHR_01.17606298.TA	HRM	HCA_1_HRM_F	CCTCCATGAAGTCAACTGTAGC
	HRM	HCA_1_HRM_R	TGCATGGCGAGTGCTGTTA
HCA_I_CHR_14.14799348.TC	HRM	HCA_2_HRM_F	CTGAGGGTGCAAAGGCAAA
	HRM	HCA_2_HRM_R	CTTCCACGCGCTGAGATGT
TQS_C_CHR_07.7671436.AG	Sanger	Sec_TQS_1_F	ATCTCTAACGCCCTTGTGCC
	Sanger	Sec_TQS_1_R	GCATGGTCGCCATCCTTTCT
TQS_C_CHR_19.431712.TC	Sanger	Sec_TQS_2_F	GTCCAACCTCAAGTCGGAGG
	Sanger	Sec_TQS_2_R	AAACCACAGCAAGCCTCACT
V_I_CHR_07.4556893.AG	Sanger	Sec_V_1_F	GAGAAGAAGAAACCGGCAGC
	Sanger	Sec_V_1_R	TGGACAAATTGCTTCCCCCA
V_C_CHR_06.12288128.GA	Sanger	Sec_V_2_F	ACAGAGCGTACTGGACTGGA
	Sanger	Sec_V_2_R	GGCTATAGTTTGGAGGGCTTGA
DBH_I_CHR_01.15809500.GT	Sanger	Sec_DBH_1_F	AACCGGAGTCGCTGTTTCTG
	Sanger	Sec_DBH_1_R	AGATGTGTACATTGTTTAAGGTG GT
DBH_C_CHR_04.2520866.CT	Sanger	Sec_DBH_2_F	TGTGACCATCAACTGGACCG
	Sanger	Sec_DBH_2_R	TCTTGGCTGAGCAGGAATGG
SG_I_CHR_01.17266971.AG	Sanger	Sec_SG_1_F	AGCTCATTAGGTCAGTAGCAGC
	Sanger	Sec_SG_1_R	CTGCAGCAGCTGAGTCATTC

SG_I_CHR_05.4640519.GA	Sanger	Sec_SG_2_F	CACACGCCACCTAACTCAA
	Sanger	Sec_SG_2_R	TGCCATATGTCTTGTGTGTTGT
HCA_I_CHR_01.17606298.TA	Sanger	Sec_HCA_1_F	GTACGTAAGCGCAAGTGCAG
	Sanger	Sec_HCA_1_R	GGTTGCACAATGGCAGGTTT
HCA_I_CHR_14.14799348.TC	Sanger	Sec_HCA_2_F	AACAAAACACGGCCAACAGG
	Sanger	Sec_HCA_2_R	CCATCCAGCCTCGACAAAGT
DBH_I_CHR_01.15809500.GT	AS-PCR	DBH_1_Rw	TCTGCTCCAAGTATGGCTAC
	AS-PCR	DBH_1_Rm	TCTGCTCCAAGTATGGCTAA
	AS-PCR	DBH_1_F	TCCTGTTATGGATTCCAAC
DBH_C_CHR_04.2520866.CT	AS-PCR	DBH_2_Fw	AATCAACGATCCTCAACACTC
	AS-PCR	DBH_2_Fm	AATCAACGATCCTCAACACTT
	AS-PCR	DBH_2_R	GCAAGTTTCTTTACCCACTG
HCA_I_CHR_01.17606298.TA	AS-PCR	HCA_1_Fw	CAGCTTGAGTTTCTATCACCTAT
	AS-PCR	HCA_1_Fm	CAGCTTGAGTTTCTATCACCTAA
	AS-PCR	HCA_1_R	TTCAATGCCTTCATATTCCT
HCA_I_CHR_14.14799348.TC	AS-PCR	HCA_2_Rw	AACTGTATGTATATATATGTGTGG A
	AS-PCR	HCA_2_Rm	AACTGTATGTATATATATGTGTGG G
	AS-PCR	HCA_2_F	TCCTTGTGAATGAGAGAGGT
SG_I_CHR_01.17266971.AG	AS-PCR	SG_1_Rw	GCATTGTCGTCTTGAAACTTAT
	AS-PCR	SG_1_Rm	GCATTGTCGTCTTGAAACTTAC
	AS-PCR	SG_1_F	ACATCAGGCTTGATCACTTC
SG_I_CHR_05.4640519.GA	AS-PCR	SG_2_Rw	TTCAAATATCTTTGGAATATGGC

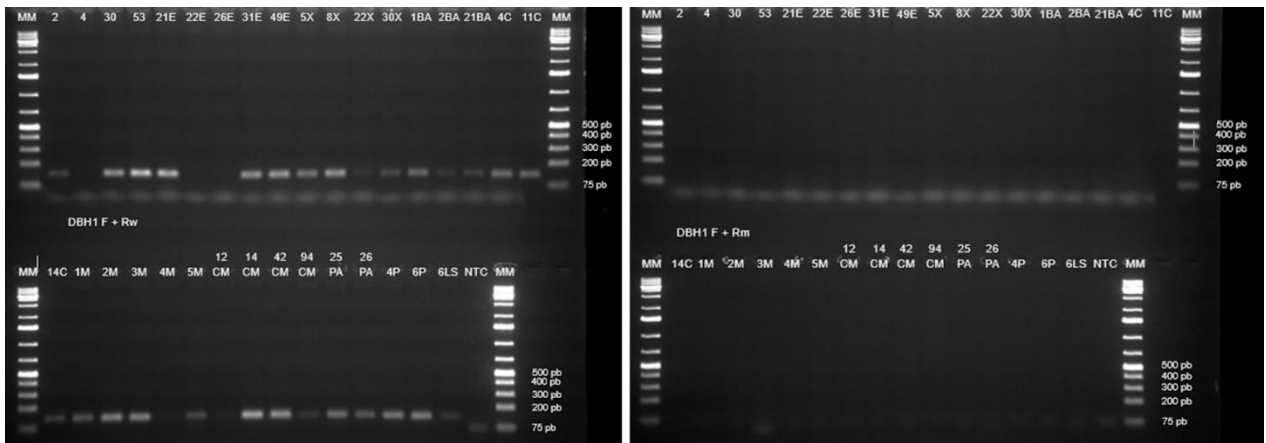
	AS-PCR	SG_2_Rm	TTCAAATATCTTTGGAATATGGT
	AS-PCR	SG_2_F	AGCTAAGCACAGCAGAAGA
TQS_C_CHR_07.7671436.AG	AS-PCR	TQS_1_Fw	CAAGACTTGAGGAACTGAATA
	AS-PCR	TQS_1_Fm	CAAGACTTGAGGAACTGAATG
	AS-PCR	TQS_1_R	AAATACAAACATCCCTCCCT
TQS_C_CHR_19.431712.TC	AS-PCR	TQS_2_Rw	TTCTGCATTTGAAGTAGGGTA
	AS-PCR	TQS_2_Rm	TTCTGCATTTGAAGTAGGGTG
	AS-PCR	TQS_2_F	CTATTGATTCAGGGCAAAG
V_I_CHR_07.4556893.AG	AS-PCR	V_1_Fw	AGATATTGCTGGAGTGAGTACA
	AS-PCR	V_1_Fm	AGATATTGCTGGAGTGAGTACG
	AS-PCR	V_1_R	ATATGCAGGCATGCTAAAGT
V_C_CHR_06.12288128.GA	AS-PCR	V_2_Fw	AGCGAGAAAGGAGATACCG
	AS-PCR	V_2_Fm	AGCGAGAAAGGAGATACCA
	AS-PCR	V_2_R	TATGGTCCAATCACCTCACT
DBH_I_CHR_01.15809500.GT	AS-PCR	DBH_1_Rw	TCTGCTCCAAGTATGGCTAC
	AS-PCR	DBH_1_Rm	TCTGCTCCAAGTATGGCTAA
	AS-PCR	DBH_1_F	TCCTGTTATGGATTCCAACCT

En primera instancia se realizó la secuenciación Sanger (Fig. 3) para verificar la presencia del SNP y poder hacer una comparación entre las tres plataformas.



**Figura 3.** Electroferograma de secuenciación Sanger para el rasgo DBH1, SNP GG en los clones **a)** 49E, **b)** 3M, **c)** 4C **d)** 53.

Posteriormente se realizó la estandarización de la PCR según el trabajo con la plataforma AS-PCR, lo cual involucró una serie de pruebas con las temperaturas de alineamiento para los imprimadores. Una vez se logró estandarizar, se realizó la AS-PCR para los rasgos seleccionados (Cuadro 5) y se visualizó por medio de geles de agarosa (Fig. 4).



**Figura 4.** Gel de agarosa para el rasgo DBH1, la combinación F-Rw (izquierda) y la combinación F-Rm (derecha) para 33 genotipos de teca.

Con los datos observados en los geles de agarosa y en la secuenciación, se generó una base de datos donde se pueden comparar las plataformas y así validar los resultados entre ellas. Como se observa en el Cuadro 6 se puede comparar GWAS (objetivo 2) y AS-PCR

**Cuadro 6.** Porcentajes de similitud entre los resultados de las plataformas GWAS y AS-PCR, en genotipos de *Tectona grandis*.

Primer	Genotipo GWAS	Genotipo AS-PCR	Total	Porcentaje de similitud
DBH1	GG	GG	17	100
	GT	GG	13	0
DBH2		CC	2	
	CT	CT	5	55,56
		TT	2	
	TT	CT	14	33,33
		TT	7	
HCA1	AA	AA	1	100
		AA	5	
	TA	TA	3	33,33
		TT	1	
	TT	AA	2	
		TA	1	50
		TT	3	
HCA2	CC	CC	2	100
		CC	2	
	TC	TC	6	75
		CC	4	
	TT	TC	1	44,44
		TT	4	
SG1	AG	AG	7	77,78
		GG	2	
	GG	AG	16	27,27
		GG	6	
SG2	AA	GG	16	0
	GA	GG	6	0
TQS1	AA	AA	6	28,57

		AG	15	
	AG	AA	1	83,33
		AG	5	
	TC	TC	5	100
TQS2		CC	3	
	TT	TC	16	13,64
		TT	3	
	AA	AA	7	29,17
V1		AG	17	
	AG	AA	1	50
		AG	2	
		GG	1	
	GA	GA	3	42,86
V2		GG	4	
	GG	GA	1	95,65
		GG	22	

En el Cuadro 7 se observa la comparación entre GWAS y secuenciación Sanger.

**Cuadro 7.** Porcentajes de similitud entre los resultados de las plataformas GWAS y Sanger, en genotipos de *Tectona grandis*.

Primers	Genotipo GWAS	Genotipo Sanger	Total	Porcentaje de similitud
DBH1	GG	GG	2	100
	GT	GG	2	0
DBH2	CT	CT	1	50
		TT	1	
	TT	CT	2	0
HCA1	AA	AA	1	100
	TA	TA	2	100
	TT	TT	1	100
HCA2	CC	CC	2	100
	TC	CC	1	50
		TC	1	
	TT	TC	1	50

		TT	1	
SG1	AG	AA	2	0
	GG	GG	2	100
SG2	AA	AA	2	100
	GA	GG	2	0
TQS1	AA	AA	2	100
	AG	AA	2	0
TQS2	TC	CC	1	50
		TC	1	
	TT	TT	2	100
V1	AA	AA	2	100
	AG	AA	1	50
		AG	AG	1
V2	GA	GA	1	50
		GG	1	
	GG	GG	2	100

En el Cuadro 8 se observa la comparativa entre secuenciación Sanger y AS-PCR.

**Cuadro 8.** Porcentajes de similitud entre los resultados de las plataformas Sanger y AS-PCR, en genotipos de *Tectona grandis*.

Primers	Genotipo GWAS	Genotipo Sanger	Total	Porcentaje de similitud
DBH1	GG	GG	2	100
	GT	GG	2	0
DBH2	CT	CT	1	50
		TT	1	
	TT	CT	2	0
HCA1	AA	AA	1	100
	TA	TA	2	100
	TT	TT	1	100
HCA2	CC	CC	2	100

	TC	CC	1	50
		TC	1	
	TT	TC	1	50
		TT	1	
SG1	AG	AA	2	0
	GG	GG	2	100
SG2	AA	AA	2	100
	GA	GG	2	0
TQS1	AA	AA	2	100
	AG	AA	2	0
TQS2	TC	CC	1	50
		TC	1	
	TT	TT	2	100
V1	AA	AA	2	100
	AG	AA	1	50
		AG	1	
V2	GA	GA	1	50
		GG	1	
	GG	GG	2	100

La plataforma HRM no se logró desarrollar en el tiempo del proyecto debido a que el equipo de laboratorio requerido en el CENIBIOT se dañó desde inicios del 2024 y no ha podido ser restablecido hasta la fecha. Sin embargo, la detección de SNPs con AS-PCR podrá servir de referencia para trabajar con la plataforma HRM.

Dado que uno de los factores limitantes para el pleno desarrollo de la genómica en teca ha sido la base de secuenciación limitada (33 genotipos), se hicieron esfuerzos para establecer en campo nuevos ensayos genéticos con una población de al menos 100 genotipos. Esta actividad no estaba contemplada en el proyecto, pero es esencial para continuar refinando y ampliando la base de SNP's asociados a rasgos de importancia económica. Al respecto se diseñó un nuevo tipo de ensayo de campo, capaz de albergar más accesiones por unidad de área y a la vez, que permita acelerar la evaluación y selección en el ensayo genético. El

nuevo diseño genético se denominó *Double Tree Plot* y una nueva versión, *Triple Tree Plot*. El primer diseño ya ha sido establecido en campo con melina, mientras que el segundo diseño será establecido con una nueva colección de teca en el II semestre del 2025, en el campus del TEC en Santa Clara, San Carlos. Al respecto se realizó una presentación de este nuevo diseño genético en la recién celebrada reunión del grupo de Genética Forestal de Norte América (junio 2024, Oaxaca, México) “Murillo, O, Badilla, Y. 2024. **Double Tree Plot as a design for accelerating genetic testing**. In: North American Forest Genetics Symposium. Oaxaca, México, 10-14 Junio 2024.”

## **Discusión**

De manera general, el proyecto logró cumplir plenamente con los objetivos 1 y 2, mientras que logró solamente un 50% del objetivo 3 por no poderse utilizar el equipo del GENIBIOT. Sin embargo, se desarrollaron actividades importantes complementarias no contempladas inicialmente, que permitirán que esta línea de I+D continúe en el tiempo. Debe comprenderse que la genómica es el campo más avanzado en el mejoramiento y conservación genética de especies agrícolas, pecuarias y forestales. Por tanto, con este proyecto se ha logrado posicionar a GENFORES y al equipo humano, como líder en la materia para la especie teca a nivel internacional.

Es importante señalar que el proyecto tenía planeado llegar hasta la detección de SNPs asociados a rasgos de importancia económica. Sin embargo, se logró dar un paso más hacia la posibilidad de predicción temprana de plantas portadoras de alelos favorables. Para esto se desarrollaron procesos de predicción basados en métodos bayesianos programados en “R”, que permitieron establecer ya como una realidad, la posibilidad de selección temprana en teca hasta con un 60% de certeza para DAP, Volumen comercial y peso específico de la madera (Callister *et al.* 2024a, Callister *et al.* 2024b).

### **Objetivo específico 1**

Con respecto al primer objetivo se logró con ambas especies, el desarrollo y validación de dos Multiplex que agrupan cuatro o cinco marcadores (SSR) cada uno. Con este procedimiento se logra reducir significativamente los costos de genotipado y uso de los marcadores a nivel comercial para ambas especies. Debe mencionarse que el desarrollo y validación de marcadores SSR o microsatélites, sigue siendo actualmente, el marcador genético más avanzado y utilizado, hasta tanto no se logre imponer el uso de los nuevos SNPs basados en la secuenciación genómica. Por tanto, nuestro grupo de trabajo logra consolidar y asegurar con este proyecto, su utilización para la comunidad científica y empresarial internacional. GENFORES logra con esto asumir el liderazgo en el desarrollo de marcadores genéticos para las especies teca y melina a nivel internacional. Al respecto, se logró publicar un artículo científico para teca donde se comparte con la comunidad científica su utilización, descripción de los imprimadores, entre otros aspectos (Méndez *et al.* 2025).

En el caso de la melina no se ha logrado aún una publicación científica formal, aunque si se logró consolidar la misma información como parte de una tesis de licenciatura que concluyó a finales del 2024 (García, Beatriz). La información, por tanto, ya está en el repositorio del TEC y disponible para el público en general. Con esto el primer objetivo específico fue logrado en su totalidad y se publicó la información respectiva.

De manera adicional, la información generada por el proyecto con el refinamiento y validación de los marcadores genéticos microsatélites SSR, ha sido ampliamente difundida en los cursos regulares de mejoramiento genético de Ing. Forestal del TEC, en un curso internacional de mejoramiento genérico desarrollado en la Universidad de Pinar del Río (Cuba), en el I Curso Internacional de Recursos Genéticos de la red latinoamericana de Genética Forestal (LACFORGEN), así como mediante dos conferencias Webinar, conferencias de IUFRO y conferencias para el sector forestal del Perú (Ver detalles en el segmento de divulgación de la información).

## **Objetivo específico 2**

Como se señaló en la sección de resultados, este objetivo fue también plenamente logrado en toda su extensión. Los resultados fueron debidamente divulgados mediante una publicación científica (Scopus), en la reunión mundial IUFRO en Suecia (2024) y en al menos cinco conferencias internacionales (Webinar en inglés y en español), cursos locales e internacionales.

Hay que señalar que no solo se logró determinar más de 40 SNPs asociados con rasgos de importancia económica (Cuadro 3), sino que se avanzó un paso más para determinar la posibilidad de predicción a edad temprana en plantas juveniles la presencia de alelos favorables. Con esto se posibilita el uso de los SNPs como nuevos marcadores genéticos, que muy pronto podrán complementar con los SSR microsatélites en trabajos de genotipado, de verificación de pureza clonal, verificación de cruces controlados, entre otros usos posibles.

La mayor limitante del proyecto ha sido la base de 33 genotipos de teca utilizados durante la secuenciación, que era la población disponible en ese momento, con datos sólidos de campo de hasta ocho años (ensayos genéticos). A pesar de esto, los resultados de predicción para selección temprana han sido sumamente promisorios. Por ejemplo, si una de las empresas miembro de GENFORES tiene una base de 100 árboles plus y concentra

su selección élite en los mejores 20 clones, 12 de ellos tendrían total certeza de portar alelos favorables para calidad del fuste, crecimiento del DAP y del volumen comercial, y al menos ocho de los 20 tendrían certeza de una mayor densidad de su madera.

Es muy probable que los SNPs no lleguen todavía a reemplazar el trabajo en ensayos genéticos en campo, hasta tanto no se logre ampliar la base poblacional con al menos 200 genotipos secuenciados y asociados a una buena base de datos. Esta será la dirección del trabajo a seguir para continuar con la I + D en genómica de teca y pronto, con melina.

### **Objetivo específico 3**

Este objetivo logró alcanzar su mayor producto esperado, cual fue el desarrollo de nuevos marcadores genéticos basados en los SNPs asociados a rasgos de importancia económica. Se diseñaron los imprimadores basados en una sola letra (Allele Specific PCR), se enviaron a construir (fuera del país) y se validaron con varias muestras de teca, una de ellas independiente con nuevos individuos. Sin embargo, no se logró realizar el mismo ejercicio con la segunda plataforma denominada HRM (High Resolution Melting), debido a que el equipo a utilizar en el CENIBIOT se dañó desde el 2024.

A pesar de que no se logró construir y comparar con el otro tipo de imprimador HRM, lo relevante es que, si se cuenta con nuevos marcadores basados en SNPs, disponibles y validados para su utilización por parte de la comunidad científica internacional y nacional. Se espera en breve lograr publicar estos nuevos hallazgos.

Como se mencionó en la sección de resultados, una de las debilidades del proyecto en general ha sido que la base de secuenciación se basó en solamente 33 genotipos y un par de cruces controlados. Los proyectos internacionales de genómica se desarrollan a partir de consorcios de empresas e instituciones, donde se logra secuenciar 400, 500 o más genotipos (Gratapaglia 2022) y se detectan más de 50 000 SNPs. En nuestras investigaciones con 33 genotipos se determinaron poco más de 10 500 SNPs, de los cuáles, más de 40 registraron una fuerte relación con rasgos económicos. Por tanto, el grupo nacional de genómica de teca debe ampliar la base de secuenciación en al menos 200 genotipos, para poder continuar con la verificación y refinamiento de los SNPs y lograr aumentar las correlaciones de predicción. A pesar de no estar incluido en los productos esperados de este proyecto, se decidió iniciar con el establecimiento de nuevos ensayos genéticos, de mayor precisión y con un número mayor de genotipos. Se propuso un nuevo

diseño de ensayo genético denominado *Double Tree Plot*, que básicamente planta los árboles en un espaciamiento más reducido, con el fin de acelerar la selección y eliminación. Esta nueva propuesta de ensayo genético ya se ha venido estableciendo con varias especies, con teca y melina en la zona norte de Costa Rica, para lograr en un plazo corto poder ampliar los trabajos en genómica. El nuevo diseño fue compartido con la comunidad científica en el pasado Simposio de Genética Forestal de Norte América (Murillo y Badilla 2024).

## **Conclusiones**

Los nuevos marcadores genéticos SSR (microsatélites) agrupados en Multiplex para teca y melina, permitirán disminuir costos, aumentar precisión y calidad de genotipado con ambas especies.

Se determinó un grupo de 13 SNPs asociados con los rasgos calidad del fuste, crecimiento del DAP y del volumen comercial, así como con la gravedad específica de la madera.

Se determinó una capacidad de predicción de más del 59%, de presencia de alelos favorables en plantas jóvenes de teca para la calidad del tronco, crecimiento del DAP y del volumen comercial.

Se cuenta con nuevos marcadores SNPs validados para el genotipado y evaluación poblacional de la teca.

## **Recomendaciones**

Se recomienda ampliar la base de genotipos secuenciados para el refinamiento y validación de los nuevos marcadores SNPs desarrollados en este proyecto.

Es esencial y prioritario el establecimiento de nuevos ensayos genéticos con una mayor base de genotipos de teca y melina, para sustentar la continuidad de trabajo en I + D de la genómica de ambas especies.

## **Agradecimientos**

Un agradecimiento a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión del TEC por el financiamiento de la mayor parte de los trabajos realizados en esta investigación

La Escuela de Ingeniería Forestal del TEC merece un agradecimiento especial por todo el apoyo logístico, humano, de infraestructura (laboratorios, invernaderos, vehículos) y demás recursos a disposición para la realización de este proyecto.

El CENIBIOT merece también ser mencionado por todo el apoyo con personal, con servicios de marcadores genéticos, apoyo estudiantil, análisis de información, entre muchos otros.

## Referencias

- Albaugh, T. J., Albaugh, J. M., Fox, T. R., Allen, H. L., Rubilar, R. A., Trichet, P., ... & Linder, S. (2016). Tamm Review: Light use efficiency and carbon storage in nutrient and water experiments on major forest plantation species. *Forest Ecology and Management*, 376, 333-342. DOI 10.1016/j.foreco.2016.05.031
- Anuagasi, C. L., Onuorah, J. A., & Okigbo, R. N. (2017). Fungal pathogens affecting seedlings of *Gmelina arborea* Roxb and *Tectona grandis* Lf and effect of three plant extracts. *International Journal of Agricultural Technology*, 13(3), 307-330.
- Araya-Valverde, E; Bogantes, A; Holst, A; Vargas-Mora, C; Gómez-Alpízar, L; Brenes, A; Sánchez-Barrantes, E; Chavarría, M; Barboza-Barquero, L. 2019. Field performance of hermaphrodite papaya plants obtained through molecular selection and micropropagation. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 19(4): 420-427.
- Arguedas Gamboa, Murillo, O; Ayuso, F; Madrigal, O. 2005. Variación en la resistencia de clones de teca (*Tectona grandis* L.f.) ante la infección de la roya (*Olivea tectonae* Rac.) en Costa Rica. *Kurú: Revista Forestal* 2(6):10 p.
- Arguedas, M; Chaverri, P; Verjans, JM. 2004. Problemas fitosanitarios en teca (*Tectona grandis* L.f.) en Costa Rica. *Revista Forestal Centroamericana* 41: 131-136.
- Arguedas, M; Mata, R; Herrera, W; Arias, D; Calvo, J; Salas, B. 2006. Síndrome de Decaimiento Lento de la Teca en Costa Rica. Segunda Etapa. Cartago, CR, Escuela de Ingeniería Forestal, Centro de Investigación en Integración Bosque-Industria. 186 p.
- Arguedas, M, Chaverri, P; Millar, C. 1995. Cancro Nectria en especies forestales. Cartago, CR, ITCR-CIT. Serie. Plagas y enfermedades forestales no.18: 8.
- Arguedas, M., Rodríguez-Solis, M., Moya, R., & Berrocal, A. (2018). *Gmelina arborea* "death disease" in fast-growth plantations: Effects of soil and climatic conditions on severity and incidence and its implications for wood quality. *Forest Systems*, 27(1), 003. <https://doi.org/10.5424/fs/2018271-12236>
- Arias, C. Á., Cruz, R. M., Castro, W. H., Hurtado, G. F., Gamboa, O. M., & Aguilar, D. A. (2017). Photosynthetic Behavior of *Gmelina Arborea* Genotypes in Rooted Mini-Cuttings Stage under Nursery Conditions, at South Pacific of Costa Rica. *International Journal of Applied*, 7(3).
- Arias, C. Á., Gamboa, O. M., Aguilar, D. A., & Cruz, R. M. (2016). Early Selection Potential of *Gmelina arborea* Roxb. Clones Based on Physiological Correlations of Their Nursery-Field behavior. *International Journal of Applied*, 6(1). ISSN 2221-0997
- Badilla, Y.; Murillo, O.; Azofeifa, M. & Obando, G. 2003. Avances en Reforestación Clonal en Costa Rica. *En: V Congreso Forestal Nacional*. 17-19 de setiembre del 2003. San José, Costa Rica.
- Becker, R., Ulrich, K., Behrendt, U., Kube, M., & Ulrich, A. (2020). Analyzing ash leaf-colonizing fungal communities for their biological control of *Hymenoscyphus fraxineus*. *Frontiers in Microbiology*, 11, 2653.
- Bhat KM (2000) Timber quality of teak from managed tropical plantations with special reference to Indian plantations. *Bois For Trop* 263:5–15
- Booth C. 1977. *Fusarium*. Laboratory Guide to the Identification of the Major Species. Commonwealth Mycological Intitute. Kew, Surrey, England. 58 p.
- Borges R. C., Macedo, M. A., Cabral, C. S., Rossato, M., Fontes, M. G., Santos, M. D., ... & Boiteux, L. S. (2018). Vascular wilt of teak (*Tectona grandis*) caused by *Fusarium oxysporum* in Brazil. *Phytopathologia Mediterranea*, 57(1), 115-121. DOI: 10.14601/Phytopathol\_Mediterr-20896
- Bradbury, PJ; Zhang, Z; Kroon, DE, Casstevens, TM; Ramdoss, Y, Buckler, ES. 2007. TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23(19):2633-5.

- Briceño-Elizondo, E., Arias-Aguilar, D., Guevara-Bonilla, M., Esquivel-Segura, E., Arguedas-Gamboa, M., Canessa-Mora, R., ... & Jakobsen, B. (2016). Effects of High Intensity Tillage Applications to Improve Productivity on Established Teak (*Tectona grandis*) Plantations in Specific Site Conditions in Northern Costa Rica. *Journal for Applied Life Sciences*. Submitted.
- Brito, R. A. S., Cavalcante, G. P., Stock, V. M., Colman, A. A., dos Santos, D. P., Sermarini, R. A., & Maffia, L. A. (2020). Trichoderma species show biocontrol potential against Ceratocystis wilt in mango plants. *European Journal of Plant Pathology*, 158(3), 781-788.
- Callister, A.; Jiménez-Madrigal, J.P.; Whetten, R.; Murillo, O. 2024. Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones. *Silvae Genetica* 73:13–23. <https://doi.org/10.2478/sg-2024-0002>
- Callister, A., Murillo, O., Jiménez, J.P. 2024. **The future is genomic: rapid clone selection for teak productivity and value.** In: XXVI IUFRO World Congress 2024. FORESTS AND SOCIETY TOWARDS 2050. Strengthening Teak Forest Management for Sustainable Teakwood Supply Chains and Trade. *Stockholm, Sweden; 23-29 June 2024*.
- Catchen, J. M., Amores, A., Hohenlohe, P., Cresko, W., & Postlethwait, J. H. (2011). Stacks: building and genotyping loci de novo from short-read sequences. *G3: Genes, genomes, genetics*, 1(3), 171-182.
- Chacón, P; Murillo, O. 2005. Análisis comparativo de la producción de minijardines clonales hidropónicos y jardines clonales en tierra de melina (*Gmelina arborea* Roxb.). *Kurú: Revista Forestal* 2(6):7 p.
- Chaves, E; Fonseca, W. 1991. Teca, *Tectona grandis* L.f., especie de árbol de uso múltiple en América Central. Turrialba, Costa Rica, CATIE.47 p. (179)
- Desprez-Loustau, M. L., Aguayo, J., Dutech, C., Hayden, K. J., Husson, C., Jakushkin, B., ... & Vacher, C. (2016). An evolutionary ecology perspective to address forest pathology challenges of today and tomorrow. *Annals of Forest Science*, 73(1), 45-67. DOI 10.1007/s13595-015-0487-4
- Dick M.W. 1990. Key to *Pythium*. University of Reading Press, Reading, U.K. 64 p
- Diningrat, D. S., Widiyanto, S. M., Pancoro, A., Shim, D., Panchangam, B., Zembower, N., & Carlson, J. E. (2015). Transcriptome of teak (*Tectona grandis*, Lf) in vegetative to generative stages development. *Journal of Plant Sciences*, 10(1), 1. DOI: 10.3923/jps.2015.1.14
- Doilom, M., Shuttleworth, L. A., Roux, J., Chukeatirote, E., & Hyde, K. D. (2015). Botryosphaeriaceae associated with *Tectona grandis* (teak) in Northern Thailand. *Phytotaxa*, 233(1), 1-26. DOI: 10.11646/phytotaxa.233.1.1
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación IT). 2002. Evaluación de los recursos forestales mundiales 2002: Informe principal. Roma. 468 p.
- Fonseca, W. 2004. Manual para productores de teca (*Tectona grandis* L.f). Universidad Nacional. Heredia Costa Rica. 121 p.
- 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. *Genetic resources and crop evolution*, 63(6), 961-974. DOI 10.1007/s10722-015-0293-8
- Galeano, E., Vasconcelos, T. S., Vidal, M., Mejia-Guerra, M. K., & Carrer, H. (2015). Large-scale transcriptional profiling of lignified tissues in *Tectona grandis*. *BMC plant biology*, 15(1), 221. DOI 10.1186/s12870-015-0599-x
- García-Valenciano, B. 2024. Tesis Lic. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Escuela de Ing. Forestal. Validación de protocolo de PCR Múltiples con microsatélites para melina (*Gmelina arborea* Roxb.). Cartago, Costa Rica.

- Gilman, A. C., Letcher, S. G., Fincher, R. M., Perez, A. I., Madell, T. W., Finkelstein, A. L., & Corrales-Araya, F. (2016). Recovery of floristic diversity and basal area in natural forest regeneration and planted plots in a Costa Rican wet forest. *Biotropica*, 48(6), 798-808. DOI 10.1111/btp.12361.
- Grattapaglia, D., M.D.V. Resende. 2011. Genomic selection in forest tree breeding. *Tree Genetics & Genomes* (7): 241–255.
- Grattapaglia D (2022). Twelve years into genomic selection in forest trees: climbing the slope of enlightenment of marker assisted tree breeding. *Forests* 13(10): 1554. <https://doi.org/10.3390/f13101554>
- Gunnell P.S. 1986. Characterization of the telemorphs of *Rhizoctonia oryzae-sative*, *Rhizoctonia oryzae*, and *Rhizoctonia zaeae* and the effect of cultural practices on aggregate sheath spot of rice, cause by *R. oryzae-sative*. Ph.D. Thesis. University of California, Davis. 103 p
- Halecker, S., Wennrich, J. P., Rodrigo, S., Andrée, N., Rabsch, L., Baschien, C., ... & Schulz, B. (2020). Fungal endophytes for biocontrol of ash dieback: The antagonistic potential of *Hypoxylon rubiginosum*. *Fungal ecology*, 45, 100918.
- Halifu, S., Deng, X., Song, X., & Song, R. (2019). Effects of two Trichoderma strains on plant growth, rhizosphere soil nutrients, and fungal community of *Pinus sylvestris* var. mongolica annual seedlings. *Forests*, 10(9), 758.
- 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. DOI 10.1007/s11295-014-0802-5
- Hirao, T., & Goto, S. (2016). Genetic composition of exotic and native teak (*Tectona grandis*) in Myanmar as revealed by cpSNP and nrSSR markers. *Conservation genetics*, 17(2), 251-258.
- Hocking, D. 1968. Stem canker and pink stain of Teak in Tanzania associated with *Fusarium solani*. *Plant Disease Reporter* 52:628–629.
- Hodge, G.R. y W.S. Dvorak, 2003. The CAMCORE International Provenance/Progeny Trials of *Gmelina arborea*: genetic parameters and potential gain. In *Recent Advances with Gmelina arborea* (eds. W. S. Dvorak, G. R. Hodge, W. C. Woodbridge and J. L. Romero). CD-ROM. CAMCORE, North Carolina State University. Raleigh, NC. USA. 20p.
- Huang, G. H., Liang, K. N., Zhou, Z. Z., & Ma, H. M. (2016). SSR genotyping—genetic diversity and fingerprinting of teak (*Tectona grandis*) clones. *Journal of Tropical Forest Science*, 48-58.
- INEC. Encuesta Nacional Agropecuaria noviembre 2018. Resultados Generales de la Actividad Agrícola y Forestal. San José, Costa Rica. 73 p.
- Lawrence, L., Menon, S., Vincent, S., Sivaram, V. P., & Padikkala, J. (2016). Radical scavenging and gastroprotective activity of methanolic extract of *Gmelina arborea* stem bark. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*, 7(2), 78-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaim.2016.06.003>
- Liao MH, Li CH, Qi JF, Hong Y. (2010). Isolation and characterization of 11 polymorphic microsatellite loci for *Gmelina arborea*. *Mol Ecol Resour* 10:1106–1108
- Longworth, J. B., & Williamson, G. B. (2018). Composition and Diversity of Woody Plants in Tree Plantations versus Secondary Forests in Costa Rican Lowlands. *Tropical Conservation Science*, 11, 1940082918773298. DOI: 10.1177/1940082918773298
- Mafia, R.G.; Alfenas, A.C.; Ferreira, E.M. e Binoti, D.H.D. 2011. Método de seleção e identificação de fontes de resistência à Murcha do eucalipto causada por *Ceratocystis fimbriata*. *Revista Árvore* v.35, n.4, p.817-824.
- Manokar, J., Balasubramani, S. P., & Venkatasubramanian, P. (2017). Nuclear ribosomal DNA–ITS region based molecular marker to distinguish the medicinal plant *Gmelina arborea* Roxb. Ex Sm. from its substitutes and adulterants. *Journal of Ayurveda and integrative medicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jaim.2017.10.001>

- Masiero, M., Secco, L., Pettenella, D., & Brotto, L. (2015). Standards and guidelines for forest plantation management: A global comparative study. *Forest Policy and Economics*, 53, 29-44. <http://dx.doi.org/10.1016/j.forpol.2014.12.008>
- Méndez, D., Araya, E., Badilla, Y., Jiménez, J.P., Murillo, O. 2025. Validated multiplex PCR of microsatellites for breeding purposes, clonal fidelity and controlled crosses in teak (*Tectona grandis* L.f.). *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. Volume 25
- Mitchell, R.G.; Wingfield, M.J.; Hodge, G.R.; Steenkamp, E.T. and Coutinho, T.A. 2012. Selection of *Pinus* spp in South Africa for tolerance to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* (2012) 43:473–489.
- Mohd, A; Lee, S; Maziah, Z; Rosli, H; Norwati, M. 2005 Basal Root Rot, a new Disease of Teak (*Tectona grandis*) in Malaysia caused by *Phellinus noxius*. *Malaysian Journal of Microbiology* .1(2):.40-45.
- Morales-Rodríguez, C., Bastianelli, G., Aleandri, M., Chilosi, G., & Vannini, A. (2018). Application of *Trichoderma* spp. complex and biofumigation to control damping-off of *Pinus radiata* D. Don caused by *Fusarium circinatum* Nirenberg and O'Donnell. *Forests*, 9(7), 421.
- Murillo, O. 1992. Diseño de un huerto semillero de *Gmelina arborea* para la producción de semilla certificada en la zona norte de Costa Rica. *Tecnología en Marcha*. Vol 11 (3): 51-58 p.
- Murillo, O.; Guevara, V. 2013. Estado de los recursos genéticos forestales de Costa Rica. MINAET/FAO/CONAGEBIO, San José, Costa Rica. 159 pp.
- Murillo, O; Rojas, JL; Badilla, Y. 2003. Reforestación clonal. Cartago, CR, ITCR, Escuela de Ingeniería Forestal. 36 p.
- Murillo, O, Badilla, Y. 2024. **Double Tree Plot as a design for accelerating genetic testing**. In: North American Forest Genetics Symposium. Oaxaca, México, 10-14 Junio 2024.
- Murillo, O., 2024. **GENFORES. Cooperativa de Conservación y Mejoramiento Genético Forestal**. Boletín. Taller de Publicaciones. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Junio 2024. Cartago, Costa Rica. 26 pp.
- Murillo, O. 2024. **GENFORES Hoy**. Asamblea anual de miembros de GENFORES. Campus Tecnológico ITCR, Santa Clara, San Carlos. 8 de agosto
- Murillo, O. 2024. **GENFORES Modelo Academia – Sector Productivo: Modelo de negocios relacionados con recursos genéticos forestales**. En: 2do Encuentro Regional sobre Innovación, Emprendimiento y Transferencia de Conocimiento en Centroamérica. Universidad de Costa Rica. 24-25 setiembre, 2024, San Pedro, Costa Rica.
- Murillo, O. 2025. **Manejo de recursos genéticos forestales ante los desafíos del cambio climático**. En: XIII Simposio Int. Manejo Sost. Rec. For. 22-24 Abril. Facultad Ciencias Forestales y Agropecuarias, Universidad de Pinar del Río, Cuba.
- Naik, D., Singh, D., Vartak, V., Paranjpe, S., & Bhargava, S. (2009). Assessment of morphological and genetic diversity in *Gmelina arborea* Roxb. *New forests*, 38(1), 99-115.
- Noumi, N., Zapfack, L., & Pelbara, P. (2018). Afforestation/Reforestation Based on *Gmelina arborea* (Verbenaceae) in Tropical Africa: Floristic and Structural Analysis, Carbon Storage and Economic Value (Cameroon). *Sustainability in Environment*, 3(2), 161. DOI: 10.22158/se.v3n2p161
- Oficina Nacional Forestal. 2013. Usos y aportes de la madera en Costa Rica. Estadísticas 2012. Heredia, Costa Rica. 31 pp.
- Ogoshi A., Oniki M., Araki T., Ui T. 1983. Studies on the anastomosis groups of binucleate *Rhizoctonia* sand their perfect. *J. Fac. Agr. Hokkaido Univ.* 61:244-260.
- Oniki M., Ogoshi A., Araki T., Sakai R., Tanaka S. 1985. The perfect stage of *Rhizoctinia oryzae* and *R. zeae* and the anastomosis groups of *Waitea circinata*. *Trans. Mycol. Soc. JPN.* 26:189-198.

- Pathala, D., Harini, A., & Hegde, P. L. (2015). A review on gambhari (*Gmelina arborea* Roxb.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 4(2).
- Pritchard, J.; Matthew; Donnelly, P. 2000. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics* 155: 945–959.
- Resende M. D. V., 2007. SELEGEN-REML/BLUP: Sistema estatístico e seleção genética computadorizada via modelos lineares mistos, 1st edn. Embrapa Florestas.
- Resende, RT; Resende, MDV; Azevedo, CF; Fonseca, F; Melo, SC; Pereira, HS; Souza, TLPO; Valdisser, PAMR; Brondani, C; Pereira Vianello, R. 2018. Genome-Wide Association and Regional Heritability Mapping of Plant Architecture, Lodging and Productivity in *Phaseolus vulgaris*. *G3 (Bethesda)* 8(8): 2841-2854.
- Rivera-Méndez, W., Brenes-Madriz, J., & Zúñiga-Vega, C. (2019). Laboratorio de Biocontrol: Investigación vinculada con la producción agrícola. *Revista Tecnología en Marcha*, g-121.
- Rocha, OJ; Mendez-Alvarez, D; Rojas-Parajeles, F; Murillo-Gamboa, O. 2020. Isolation and Characterization of Fifteen Microsatellite Loci for the Use in Breeding of *Gmelina arborea* Roxb. (Lamiaceae). *Genetic Resources* 1(2):23-28.
- Rojas, F. 2014. Uso de microsatélites para el análisis genético en una población de mejoramiento genético de *Tectona grandis* en Costa Rica. Tesis M.Sc. Facultad de Ciencias Agroalimentarias. Universidad de Costa Rica. 89 p.
- Rosero, C., Argout, X., Ruiz, M., & Teran, W. (2011). A drought stress transcriptome profiling as the first genomic resource for white teak-Gamhar (*Gmelina arborea* Roxb) and related species. In *BMC Proceedings* (Vol. 5, No. 7, p. P178). BioMed Central.
- Roux, J.; Heath, R. N.; Labuschagne, L.; Kamgan Nkuekam, G.; Wingfield, M. J., 2007: Occurrence of the wattle wilt pathogen, *Ceratocystis albifundus* on native South African trees. *Forest Pathology*. 37, 292–302
- Salas, A. 2013. Evaluación y cuantificación del efecto de la *Nectria* sp. y la aplicación de métodos preventivos para su control en plantaciones clonales de melina en la zona sur de Costa Rica. Tesis Lic. Universidad Nacional, Escuela de Ciencias Ambientales. Heredia, Costa Rica.
- Salas, A; Murillo, O.; Murillo, R.; Ávila, C.; Mata, X.; Fernández, M. En prensa. Evaluación de la severidad de la pudrición del tronco de *Gmelina arborea* Roxb.
- Shruthi, T. H., Sunkad, G., Mallesh, S. B., & Yenjerappa, S. T. (2019). Isolation and bio-efficacy screening of native *Trichoderma* species as a potential biocontrol agent against pomegranate wilt caused by *Ceratocystis fimbriata* Ellis and Halst. *J Pharmacogn Phytochem*, 8(5), 1581-1585.
- Sneh B., Burpee I., Ogoshi A. 1991. Identification of *Rhizoctonia* species. The American Phytopathological Society. St. Paul, MN. 133 p.
- Van der Plaats- Niterink A.J. 1981. Monograph of the genus *Phytium*. Studies in Mycology N 21, Centraalbureau Voor Schimmelcultures, Baarn, the Netherlands. 242 p.
- Vergara, A., Mercado, T., Jarma, A., & Gatti, K. (2017). Water Requirement of *Gmelina arborea* on Nursery Stage Under Controlled Conditions. *Floresta e Ambiente*, 24. <http://dx.doi.org/10.1590/2179-8087.012915>
- Verhaegen, D; Ofori, D; Fofana, I; Poitel, M; Vaillant, A. 2005. Development and characterization of microsatellite markers in *Tectona grandis* (Linn.f). *Molecular Ecology Notes* 5: 945-947.
- Weaver, PL. 1993. *Tectona grandis* L.f. Teak. New Orleans, US, Department of Agriculture, Forest Service, Southern Forest Experiment Station. 18 p.
- Wee, A. K., Li, C., Dvorak, W. S., & Hong, Y. (2012). Genetic diversity in natural populations of *Gmelina arborea*: implications for breeding and conservation. *New Forests*, 43(4), 411-428. DOI 10.1007/s11056-011-9288-2

- Yasodha, R., Vasudeva, R., Balakrishnan, S., Sakthi, A. R., Abel, N., Binai, N., ... & Tabata, S. (2018). Draft genome of a high value tropical timber tree, Teak (*Tectona grandis* L. f): insights into SSR diversity, phylogeny and conservation. *DNA Research*. doi: 10.1093/dnares/dsy013
- Zhan, J., Thrall, P. H., Papaix, J., Xie, L., & Burdon, J. J. (2015). Playing on a pathogen's weakness: using evolution to guide sustainable plant disease control strategies. *Annual Review of Phytopathology*, 53, 19-43. 10.1146/annurev-phyto-080614-120040.
- Zhang, W., Chu, Y., Ding, C., Zhang, B., Huang, Q., Hu, Z., ... & Su, X. (2014). Transcriptome sequencing of transgenic poplar (*Populus×euramericana* 'Guariento') expressing multiple resistance genes. In *BMC genetics* (Vol. 15, No. 1, p. S7). BioMed Central.
- Zhao, D., Hamilton JH., Wajid Waheed Bhat, Sean R. Johnson, Grant T. Godden, Taliesin J. Kinser, Benoît Boachon, Natalia Dudareva, Douglas E. Soltis, Pamela S. Soltis, Bjoern Hamberger and C. Robin Buell. 2019. A chromosomal-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: 1–10.

### **Conferencias virtuales donde se divulgó el proyecto (Webinar y otras)**

Murillo, O., Callister, A., Jiménez, J.P. 2023. **Progress in teak genomics**. Webinar. Escuela de Ing. Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 12 mayo 2023.

Jiménez-Madrigal, J.P.; Callister, A., Whetten, R., Murillo, O. 2023. Avances en la genómica de teca. Webinar. Escuela de Ing. Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica. 8 noviembre 2023.

Murillo, O. 2024. **Progreso en Mejora Genética de Teca: En la era de la Genómica y en la 2da generación de mejoramiento genético**. En: ASOTECA (Asociación Ecuatoriana de Productores de Teca y Maderas Tropicales) de Ecuador 20 de octubre, 2024, Guayaquil, Ecuador.

Murillo, O. 2024. **Impacto del mejoramiento genético en la empresa forestal**. Conferencia internacional WEBINAR. Instituto Nacional de Bosques (INAB), Guatemala. 5 agosto.

Murillo, O. 2024. **Silvicultura y Mejoramiento Genético en especies tropicales de Latinoamérica**. Organizado por el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego y el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú, el 8 de noviembre (2024) en la ciudad de Cajamarca, Perú.

Murillo, O. 2024. **Conciliación entre la Mejora Genética y la Conservación Genética**". Organizado por la Facultad de Ciencias de la Tierra y el Mar y la Escuela de Ciencias Ambientales, el 15 de noviembre (2024) en el campus de la Universidad Nacional en Heredia, Costa Rica.

Murillo, O. 2024. **“GENFORES: Tropical Tree Improvement Cooperative”**. IUFRO Workshop. Organizado por el ICIFOR-INIA, CSIC (España), el 27-29 de noviembre (2024) en Madrid, España

# Genomic predictions and candidate single nucleotide polymorphisms for growth, form, and wood properties of teak clones

Andrew N. Callister<sup>1,2</sup>, Jose P. Jiménez-Madrigal<sup>3</sup>, Ross W. Whetten<sup>4</sup>, Olman Murillo<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup> Treehouse Forest Research LLC. Check, VA, USA

<sup>2</sup> School of Agriculture, Food and Ecosystem Sciences, University of Melbourne, Richmond, Victoria 3121, Australia. ORCID: 0000-0001-9914-7712

<sup>3</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, Alajuela, Costa Rica. ORCID: 0000-0002-0345-8899

<sup>4</sup> Department of Forestry & Environmental Resources, North Carolina State University, Raleigh, NC 27606, USA. ORCID: 0000-0002-3808-4137

<sup>5</sup> Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Ingeniería Forestal, Cartago, Costa Rica. ORCID: 0000-0003-3213-8867

\*Corresponding author: Olman Murillo, E-mail:omurillo@itcr.ac.cr

## Abstract

Teak (*Tectona grandis*) is a premier hardwood timber, extensively cultivated throughout the tropics. The study aimed to undertake the first genomic selection of teak clones using single nucleotide polymorphism (SNP) markers and evaluate the prospects for prediction of stem volume (VOL), diameter (DBH), form Quality Score (QS), Specific Gravity (SG), and Heartwood Percentage (HW). Thirty-three elite teak clones from a genetic test in northern Costa Rica were genotyped at 10812 SNP loci and aligned to the teak reference genome sequence. The genomic relationship matrix revealed 7 cryptic groups of more highly related clones and within-group kinship values were consistent with full-sib families. Clone values for each of the 5 traits were calculated from 5-year field data for 26 of the genotyped clones. Genomic prediction models were fitted to clone values using Bayesian Ridge Regression, BayesA, BayesB, BayesC, and Bayes Lasso. Predictive ability (PA) was greatest for DBH (up to 0.66), VOL (up to 0.63), SG (0.58), with 0.42 and 0.40 as the best PA for QS and HW, respectively. GWAS resulted in the discovery of 7 unique SNP markers for volume, 7 for DBH, 4 for QS, and 8 for SG. The small experimental size resulted in relatively large false discovery rates. Teak breeders are well

positioned to benefit from the genomic tools and approaches to genotyping teak breeding and deployment populations on a large scale. Significant advantages are expected from widespread integration of genomic technologies into teak breeding systems to allow shortening of the breeding cycle.

**Keywords:** *RADseq, SNP, GWAS, Genomic relationship matrix, Genomic Selection, Early selection.*

## Introduction

Teak (*Tectona grandis* L.f.;  $2n = 2x = 36$ ) is one of the world's premier hardwood timbers and is cultivated extensively in plantations throughout the tropics (Pandey and Brown 2000, Sasidharan 2021). A member of the Lamiaceae family, the natural distribution of teak spans diverse environments across India, Myanmar, Thailand and Laos (Sasidharan 2021). Genetic improvement of teak has been undertaken since the 1930s, encompassing provenance and family trials and selection of elite individuals for use as seed orchard constituents and clones for

## Validated multiplex PCR of microsatellites for breeding purposes, clonal fidelity and controlled crosses in teak (*Tectona grandis* L.f.)

Dawa Méndez-Álvarez<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-7586-5485>

Emanuel Araya-Valverde<sup>1,2\*</sup>; <https://orcid.org/0000-0002-0025-5420>

Yorleny Badilla-Valverde<sup>1</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-6743-9734>

Jose Pablo Jiménez-Madriral<sup>3</sup>, <https://orcid.org/0000-0002-0345-8899>

Olman Murillo-Gamboa<sup>1</sup>; <https://orcid.org/0000-0003-3213-8867>

<sup>1</sup>Escuela de Ingeniería Forestal, Instituto Tecnológico de Costa Rica, 1597050, Cartago, Costa Rica; [damendez@itcr.ac.cr](mailto:damendez@itcr.ac.cr); [omurillo@itcr.ac.cr](mailto:omurillo@itcr.ac.cr); [ybadilla@itcr.ac.cr](mailto:ybadilla@itcr.ac.cr)

<sup>2</sup>Centro Nacional de Innovaciones Biotecnológicas (CENIBiot), CeNAT-CONARE, 1174-1200, San José, Costa Rica; [earaya@cenat.ac.cr](mailto:earaya@cenat.ac.cr) (\*Corresponding author)

<sup>3</sup>Escuela de Ciencias Naturales y Exactas, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Alajuela, Costa Rica; [jpjimenez@itcr.ac.cr](mailto:jpjimenez@itcr.ac.cr)

### ABSTRACT

Teak is a valuable hardwood species native to India, Laos, Burma, and Thailand, and has been introduced globally due to its desirable wood characteristics. Breeding programs in teak are based on provenance and family trials and elite clone selection. Advanced breeding techniques involve controlled cross-pollination of selected individuals which requires rigorous error checking and quality control for clonal fidelity, correct parentage, and lineage verification. This study focuses on validating the efficacy of ten microsatellites optimized for multiplex PCR amplification in clonal identification and parentage testing in teak. Germplasm samples from a clonal orchard and progenies from controlled crosses in Costa Rica were used. The probability of identity (PI) and probability of exclusion (PE) values indicated high power for individual identification and parentage exclusion. Clonal identification was effective with at least five loci showing high PI and PIC values. Full sibs and clones were detected accurately within progenies, demonstrating the reliability of the ten SSRs for genetic studies in teak. In scenarios involving full-sib progenies, all ten microsatellites were necessary to maintain a power of exclusion >0.999. Instances of mismatched DNA profiles highlighted sampling errors and underscored the system's discriminatory power. Overall, the study confirms the effectiveness of these microsatellites for clonal fidelity and parentage testing, essential in clonal teak breeding programs.

# Conferencias donde se presentaron los resultados del proyecto (2023-2025)



XIII SIMFOR 2025



Manejo de recursos genéticos forestales  
ante los desafíos del cambio climático

Murillo, O. 2025. Manejo de recursos genéticos forestales ante los desafíos del cambio climático. En: XIII Simposio Int. Manejo Sost. Rec. For. 22-24 Abril. Facultad Ciencias Forestales y Agropecuarias, Universidad de Pinar del Río, Cuba.

**TEC** | Tecnológico  
de Costa Rica



## GENFORES

**Tropical Tree Improvement Cooperative**

27-29 November 2024  
*Workshop on Forest Genetic  
Trials Networks*  
Madrid, Spain

Olman Murillo  
Director GENFORES  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
School of Forestry Engineering



**Impacto del mejoramiento genético en la  
empresa forestal**

**5 Julio 2024  
INAB, Guatemala**

**Olman Murillo  
Director GENFORES  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Escuela de Ing. Forestal**

**Double Tree Plot as a design for accelerating genetic testing**

Olman Murillo  
Director GENFORES  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
School of Forestry Engineering  
**IUFRO Workshop.** Organizado por el  
ICIFOR-INIA, CSIC (España), el 27-29  
de noviembre (2024) en Madrid, España.



# UNIVERSIDAD NACIONAL DE COSTA RICA

Simposio Transformando el Futuro Forestal: Innovación Genética,  
Mercados Globales y Adaptación Climática

Otorga el presente certificado como ponente magistral a:

**Olman Murillo Gamboa**

Realizado el día 15 de noviembre del 2024, con una duración de 4 horas.  
Campus "Omar Dengo" Heredia, Costa Rica

**Dr. Federico E. Alice Guier**  
Bosques y cambio climático

**Ph.D. Sergio A. Molina-Murillo**  
Comercio internacional de  
productos forestales

**P.hD. William Hernández Castro**  
Conservación y Mejoramiento  
Genético Forestal

**Conciliación entre la Mejora Genética y la  
Conservación Genética**



SERFOR

TEC Tecnológico de Costa Rica



# Foro Internacional de Plantaciones Forestales Comerciales

Silvicultura y Mejoramiento Genético en especies tropicales de Latinoamérica



Murillo, O. 2024. **Silvicultura y Mejoramiento Genético en especies tropicales de Latinoamérica.** Organizado por el Ministerio de Desarrollo Agrario y Riego y el Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre del Perú, el 8 de noviembre (2024) en la ciudad de Cajamarca, Perú.



Murillo, O. 2024. **GENFORES Modelo Academia - Sector Productivo: Modelo de negocios relacionados con recursos genéticos forestales.**

En: 2do Encuentro Regional sobre Innovación, Emprendimiento y Transferencia de Conocimiento en Centroamérica. Universidad de Costa Rica. 24-25 setiembre, 2024, San Pedro, Costa Rica.

Instituto Tecnológico de Costa Rica



para agregar notas



**Progreso en Mejora Genética de Teca:  
En la era de la Genómica y en la 2da generación de  
mejoramiento genético**

Murillo, O. 2024. Progreso en Mejora Genética de Teca:  
En la era de la Genómica y en la 2da generación de  
mejoramiento genético. En: ASOTECA (Asociación  
Ecuatoriana de Productores de Teca y Maderas Tropicales)  
de Ecuador 20 de octubre, 2024, Guayaquil, Ecuador.



**Cooperativa Internacional de Conservación  
y Mejoramiento Genético Forestal**

Murillo, O. 2024. GENFORES Hoy.  
Campus Tecnológico ITCR, Santa  
Clara, San Carlos. 8 de agosto

Presentación al grupo de empresas miembro de GENFORES,  
durante la Asamblea Anual, celebrada en el campus Tecnológico  
en San Carlos, 8 de agosto del 2024



## Progress in teak genomics

Jose Pablo Jiménez, TEC  
Andrew Callister, TreeHouse, Australia  
Ross Whetten NCSU, USA  
Olman Murillo, TEC  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
School of Forest Engineering  
WEBinar May 12th 2023



## Avances en la genómica de teca

Jose Pablo Jiménez, TEC  
Andrew Callister, TreeHouse, Australia  
Ross Whetten NCSU, USA  
Olman Murillo, TEC  
Instituto Tecnológico de Costa Rica  
Escuela de Ing. Forestal  
WEBinar 8 Noviembre 2023

INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA

ESCUELA DE INGENIERÍA FORESTAL

**VALIDACIÓN DE PROTOCOLO DE PCR MULTIPLEX CON  
MICROSATÉLITES PARA MELINA (*Gmelina arborea* Roxb.)**

TESIS PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE INGENIERA FORESTAL CON ÉNFASIS  
EN MANEJO Y PRODUCCIÓN FORESTAL CON EL GRADO ACADÉMICO DE  
LICENCIATURA

BEATRIZ GARCÍA VALENCIANO

CARTAGO, COSTA RICA

NOVIEMBRE 2024