

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE PROGENIES DE ALISO *Alnus acuminata* H.B.K spp *acuminata*, MEDIANTE MARCADORES AFLP

RESUMEN

El aliso (*Alnus acuminata* H.B.K spp *acuminata*), es una especie forestal que gracias a su rápido crecimiento, asociación con fijadores de nitrógeno, y ventajas ecológicas, tiene un enorme potencial entre las especies leñosas. A pesar de sus virtudes como forestal, en Colombia se desconoce el grado de diversidad genética de sus poblaciones naturales y de las plantaciones existentes. En el presente trabajo se evaluaron 24 accesiones, representativas de dos progenies, denominadas Caldas y Nariño, sitios donde se realizó la selección de árboles *plus* y posterior colecta de semilla, y una población nativa de aliso localizada en el departamento del Huila. El índice de similitud de Dice, evidenció la formación de tres grupos con diferencias genéticas claras; los individuos de la progenie Caldas, de la progenie Nariño y los individuos representantes de la población nativa de Huila.

PALABRAS CLAVES: Aliso, Diversidad genética, progenies

ABSTRACT

Alnus acuminata H.B.K spp *acuminata* is forest specie with a rapid growth, associated with nitrogen fixing organisms and plenty of ecological advantages. It has a great potential among forest trees. In spite of its utilities, there is not knowledge about the genetic variability present among natural populations and in established plantations. In this article, twenty four Alder tree accessions were evaluated, they belonged to two selected progenies, from two provenances known as Caldas and Nariño, localities where the selection of plus trees was realized and seeds were collected, and a natural population from Huila. With the Dice's diversity index, three clusters were obtained, showing a clear separation between Caldas and Nariño progenies, the native population from Huila showed major genetic distances.

KEYWORDS: Alder, genetic diversity, progenies

1. INTRODUCCIÓN

La especie forestal *Alnus acuminata* se conoce con los nombres de aliso, cerezo y chaquiro en Colombia; aliso del cerro y aliso del río en la Argentina; alnus y jaúl en Costa Rica; y aliso, en México y Perú. *Alnus acuminata* H.B.K. perteneciente a la familia Betulaceae es la única especie de aliso conocida en Centro y Sudamérica (23). Se conocen tres subespecies, *Alnus acuminata* Humboldt, Bonpland & Kunth spp *acuminata*, propia de Suramérica; *Alnus acuminata* H.B.K. spp *glabrata* (Fernald) Furlow, típica del Centro y Sur de México y *Alnus acuminata* H.B.K. spp *arguta* (Schlectendal) Furlow, propia de México y América Central (4).

Es un árbol de uso múltiple, de rápido crecimiento en la zona de alta montaña de los Andes (27), los bosques de aliso juegan un importante papel en la protección de las cuencas hidrográficas, en el control de la erosión, al tiempo que son empleados en sistemas agroforestales (22).

En Colombia se encuentra de forma natural en los bosques secos, húmedos y muy húmedos del montano y montano bajo (1400 a 3200 m), en especial en los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío, Huila, Tolima, Cundinamarca y Nariño con temperaturas que oscilan entre 7°-17° C, precipitaciones anuales de 1.000 a 2.500 milímetros y alta humedad relativa (22).

MARTA LEONOR MARULANDA

Bióloga, Ph. D
Profesora Titular
Universidad Tecnológica de Pereira
mlmarulanda@yahoo.com

JOSE LUIS CLAROZ

Biólogo genetista, Esp.
Fitopatología de Yuca
CIAT.

jlclarozv@yahoo.com

ANA MARIA LOPEZ

Ingeniera Agrónoma, Esp.
Laboratorio de Biotecnología Vegetal.
Universidad Tecnológica de Pereira
anmalogo@yahoo.com

Presenta dos ecotipos: en las Cordilleras Central y Occidental, donde se le denomina cerezo, es un árbol que puede superar los 40 metros de altura y 70 cm de diámetro, mientras en la Cordillera Oriental, donde se le llama aliso, es de hábito arbustivo y en algunos sitios sólo alcanza 10 metros de altura (27).

Una característica sobresaliente son sus raíces superficiales con nódulos fijadores de nitrógeno atmosférico por simbiosis con el actinomicete *Frankia* spp (27), por lo que resulta muy adecuada para el mejoramiento de suelos. Por esta razón se emplea en sistemas agroforestales, asociado con cultivos tales como pasturas y café principalmente (2).

Sobre *Alnus acuminata* H.B.K spp *acuminata* se han publicado escasos estudios en toda América Latina enfocados a la conservación de la especie utilizando biotecnología, sobresalen los trabajos en la micropropagación por organogénesis de la especie: Hodson *et al* (1988)(17); Badilla *et al* (1992)(1); González y Vilca (1998)(12); Enrico (2000)(9). En cuanto a la caracterización molecular del aliso se conocen sólo los trabajos sobre genética de poblaciones con isoenzimas realizados en Centroamérica con *Alnus acuminata* H.B.K. spp *arguta* (23) y los trabajos realizados en la obtención de embriogénesis somática, estudio de estabilidad genética de los embriones

somáticos y la caracterización molecular de poblaciones y progenies del eje cafetero (14, 15, y 19).

A pesar de las ventajas que esta especie ofrece, en Colombia existen escasos estudios encaminados a su conservación y mejoramiento. Por lo tanto se hace necesario realizar estudios tendientes a evaluar la diversidad genética de esta especie y poder aprovechar los resultados de los mismos en programas de mejoramiento.

2. CONTENIDO

Los forestales cubren alrededor de cuatro billones de hectáreas en la superficie terrestre, son fuentes económicas y ecológicas que tienen un doble propósito; su explotación comercial y la posibilidad de mejorar el medio ambiente. Por esto, es necesario un mejor entendimiento de los mecanismos genéticos que influyen la adaptación y productividad de los recursos forestales (26).

Las especies forestales presentan algunos problemas biológicos para programas de mejoramiento genético; los largos periodos de regeneración, los altos costos de mantener una población por largo tiempo en diferentes lugares y el retorno de la inversión definitivamente es más a corto plazo en cultivos de ciclo corto (7).

Los análisis genéticos usando marcadores moleculares proporcionan una poderosa herramienta para entender la distribución de las fuentes genéticas en poblaciones forestales manejadas y silvestres (26).

Según Carson *et al.* (1996)(3), el uso de marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético forestal, permite la caracterización genotípica del material, el análisis de la estructura genética, el entendimiento de la base genética para el control de características de interés comercial y la selección asistida por marcadores (MAS).

La selección indirecta, asistida o facilitada por marcadores genéticos se ha utilizado en mejoramiento desde los primeros tiempos de la genética. Pero han sido las técnicas moleculares las que han impulsado la utilización de marcadores moleculares para la selección indirecta de caracteres, principalmente de herencia simple. (25). En forestales, los marcadores moleculares tienen un gran impacto en el mejoramiento genético, ya que, minimizan los intervalos de regeneración, incrementan la ganancia genética por generación y acumulan la información genética esencial para especies no "domesticadas". Sin embargo, a pesar del valor potencial de las herramientas moleculares en el mejoramiento, su aplicación no ha sido ampliamente utilizada (7).

El mejoramiento forestal fomenta la fijación de genes que están implicados en la expresión de caracteres fenotípicos deseables, es decir, de rasgos que son de interés comercial y/o productivo, como la altura considerable, elevada altura de bifurcación, fuste cilíndrico, recto y de gran diámetro, entre otros; así

mismo, este proceso promueve la pérdida de los genes que gobiernan otras características menos deseadas a nivel forestal (20). El inicio de programas de mejoramiento de especies requiere en consecuencia, un alto grado de conocimiento de la variabilidad genética de cada especie en particular, de tal manera que sea posible determinar los procedimientos adecuados para fijar los caracteres de interés, sin poner en riesgo de erosión genética a sus poblaciones.

Los AFLP ("Amplified Fragment Length Polymorphism") se desarrollaron a mediados de la década de los noventa (31). Estos marcadores se basan en la combinación de dos técnicas usadas para la generación de diversos tipos de marcadores moleculares: la digestión con enzimas de restricción, propia de los RFLP, y la PCR, usada para otros muchos marcadores. Los AFLP consisten en la amplificación vía PCR de fragmentos de ADN previamente digeridos por dos enzimas de restricción y ligados a dos adaptadores específicos a las enzimas utilizadas. Dos cebadores complementarios a los adaptadores permiten una amplificación consistente, sin necesidad de un conocimiento previo de las secuencias del genoma que se desea estudiar. El resultado es un elevado número de bandas por reacción que garantiza la detección de muchos polimorfismos. Usando combinaciones de cebadores diferentes o empleando diferentes enzimas de restricción y sus correspondientes adaptadores, se puede disponer de un número virtualmente ilimitado de marcadores (11). Son en general marcadores dominantes, siendo especialmente indicados para estudios de variabilidad, o para la saturación de zonas determinadas del genoma, para la búsqueda de marcadores estrechamente ligados a genes o su clonaje posicional. Además, se ha demostrado que la técnica de los AFLP es altamente reproducible (16).

En Colombia, CENICAFÉ ha estado interesado en el mejoramiento genético de especies como *Tabebuia rosea*, *Cordia alliodora* y *Alnus acuminata* con el ánimo de seleccionar aquellos individuos que permitan fomentar su cultivo en la región cafetera, producir madera para abastecer los mercados locales, nacionales e internacionales y ofrecer otra alternativa de ingresos económicos a los caficultores. Dichas investigaciones se han llevado a cabo con el apoyo del Ministerio del Medio Ambiente, los primeros resultados de este trabajo están condensados en el informe "Ensayo de procedencias y progenies para dos especies forestales tropicales de alto valor comercial (resultados 1996-2000)".

Desde 1999, el Grupo de Biodiversidad y Biotecnología de la Universidad Tecnológica de Pereira inició el acompañamiento a CENICAFÉ, a través del desarrollo y aplicación de marcadores moleculares a la selección y evaluación realizada por el grupo de investigación forestal de CENICAFÉ. Es así como se desarrollaron RAPD y AFLP para *Cordia* y posteriormente AFLP para *Alnus* y *Tabebuia*.

Durante los años 2003 y 2004 se realizó un convenio entre el Ministerio del Medio ambiente y Desarrollo, Centro Nacional de Investigaciones del Café, CENICAFE, y el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Ambientales de la Universidad Tecnológica de Pereira, para la caracterización molecular de tres especies forestales, *T. Rosea*, *C. Alliodora* y *A. acuminata* de la zona cafetera mediante la técnica molecular de AFLP (19).

Así pues, este trabajo recopila los resultados de los años 2003 y 2004 en aliso siendo un aporte al conocimiento, conservación y aprovechamiento de los recursos forestales, claves para el desarrollo del país.

2.1. Materiales y métodos

Recolección del Material Vegetal y Ubicación Geográfica: Se colectaron 60 muestras en los departamentos de Risaralda y Tolima, en los sitios conocidos como el Alto del Nudo (Municipio de Dosquebradas) y en el municipio de Herveo (Tolima), donde se encuentran los ensayos de progenies del programa ETIA de Cenicafe; así como muestras de una población nativa de Aliso en Gigante (Huila).

Durante el muestreo en campo se tomaron ramas de 16 árboles centrales de cada progenie, seleccionando las hojas jóvenes para la obtención de ADN.

Del total de muestras de árboles colectadas, se seleccionaron 24 progenies para la caracterización molecular. Los datos de procedencia e identificación de las progenies se observan en la Tabla 1.

MUESTRA	DPTO	MUNICIPIO	PROGENIE
Cal.11-4-8-1	Risaralda	Dosquebradas	Caldas
Cal.11-4-8-2	Risaralda	Dosquebradas	Caldas
Cal.11-4-8-5	Risaralda	Dosquebradas	Caldas
Cal.11-4-8-9	Risaralda	Dosquebradas	Caldas
Cal.11-4-8-14	Risaralda	Dosquebradas	Caldas
Cal.11-4-24-1	Tolima	Herveo	Caldas
Cal.11-4-24-2	Tolima	Herveo	Caldas
Cal.11-4-24-4	Tolima	Herveo	Caldas
Cal11-4-24-10	Tolima	Herveo	Caldas
Cal11-4-24-14	Tolima	Herveo	Caldas
Cal11-4-24-15	Tolima	Herveo	Caldas
Na.1-6-5-4	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6-5-5	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6-5-10	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6-5-11	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6-5-15	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6-p76-3	Risaralda	Dosquebradas	Nariño
Na.1-6.p76-7	Tolima	Herveo	Nariño
Na.1-6.p76-8	Tolima	Herveo	Nariño
Na1-6.p76-11	Tolima	Herveo	Nariño
Na1-6.p76-12	Tolima	Herveo	Nariño
Na1-6.p76-14	Tolima	Herveo	Nariño
P.Nativa 1	Huila	Gigante	Nativa
P.Nativa 2	Huila	Gigante	Nativa

Tabla 1. Sitos de colecta y procedencias de las accesiones de Aliso.

Extracción y cuantificación ADN

Las muestras de aliso se maceraron en nitrógeno líquido, y se almacenaron en tubos cónicos de 15 ml a - 80 °C. Para la extracción de muestras de ADN se utilizó el protocolo de Gilbertson - Dellaporta (1991), modificado por Gonzáles *et al.* (1995) (15). Después de hacer la extracción básica de ADN, se realizaron dos limpiezas adicionales, una con acetato de amonio y etanol absoluto, y otra en medio orgánico con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporción 25:24:1 debido a la rápida fenolización, típica del material forestal. Las concentraciones de ADN fueron cuantificadas en un espectrofotómetro (Shimadzu UV-1601) a 260 nm. La calidad del ADN extraído se observó en geles de agarosa al 0.8%.

Análisis de AFLP

Se utilizó la metodología descrita por Vos *et al.* (1995)(31) modificada por Invitrogen, y se utilizó el Kit de AFLP Invitrogen Starter Primer Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante. Para la amplificación del ADN se empleó un termociclador MJ Research PTC-100. En total se corrieron 24 muestras pertenecientes a las dos progenies y a la población nativa y cuatro combinaciones de primer.

El producto amplificado por PCR, fue separado en geles desnaturalizantes de poliacrilamida a una concentración de 6%. Los fragmentos fueron posteriormente visualizados por tinción con nitrato de plata.

Con las bandas obtenidas se construyó una matriz binaria, utilizando presencia (1) o ausencia (0). La matriz de datos fue convertida a una matriz de similitud según Nei y Li (1979) (24), utilizando el método UPGMA (unweighted pair group mean average) que generó un dendrograma mediante el paquete estadístico Numerical Taxonomy and Multivariate System NTSYSpc 2.02i (28) de Applied Biostatistics, en el cual se utilizó el coeficiente de Dice (8) para establecer la similaridad genética. El análisis de correspondencia múltiple fue determinado utilizando el mismo paquete estadístico.

2.2. Resultados y Discusión

Se evaluaron 22 combinaciones de primers, con el fin de establecer las más polimórficas para la caracterización del germoplasma de aliso. Se escogieron cuatro de ellas de acuerdo con los criterios de polimorfismo, reproducibilidad y consistencia de las bandas. La combinación que mostró mayor polimorfismo fue la *Mse* I AAC / *Eco* RI CTT (figura 1).

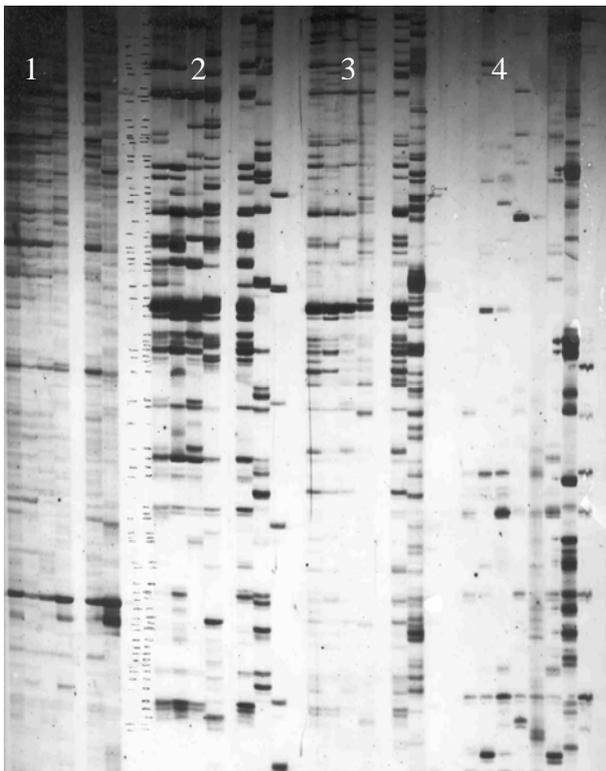


Figura 1. Amplificación positiva de los mismos individuos de la figura anterior. Las combinaciones son en su orden son 1. EAA-MC, 2. EAAC-MCTT, 3. EAA-MCTC, 4. ATC-CTG.

Las cuatro combinaciones produjeron un total de 87 bandas, 54 de ellas polimórficas.

El análisis AFLP con el índice de similitud de Dice arrojó el dendrograma de la figura 2, donde se diferenciaron tres grupos genéticos a partir de un 60% de similitud. Los individuos de la progenie Caldas, identificados en el dendrograma como (Cal, 11481 hasta Cal1142410) se ubicaron en un mismo grupo compartiendo un 65% de similitud genética (Cluster 1). Los individuos de la progenie Nariño identificados en el dendrograma como Na, 1655 hasta Na16p761 se ubicaron en un mismo grupo compartiendo un 60% de similitud (Cluster 2).

El individuo identificado como Na 1654, del grupo de progenies de Nariño, se agrupó en el cluster 1 con los individuos de Caldas. Los individuos representantes de la población nativa de Gigante, Huila, mostraron diferencias claras al compararlos con el resto del grupo, pero entre ellos son bastante similares pues comparten el 90% del genoma analizado (Cluster 3).

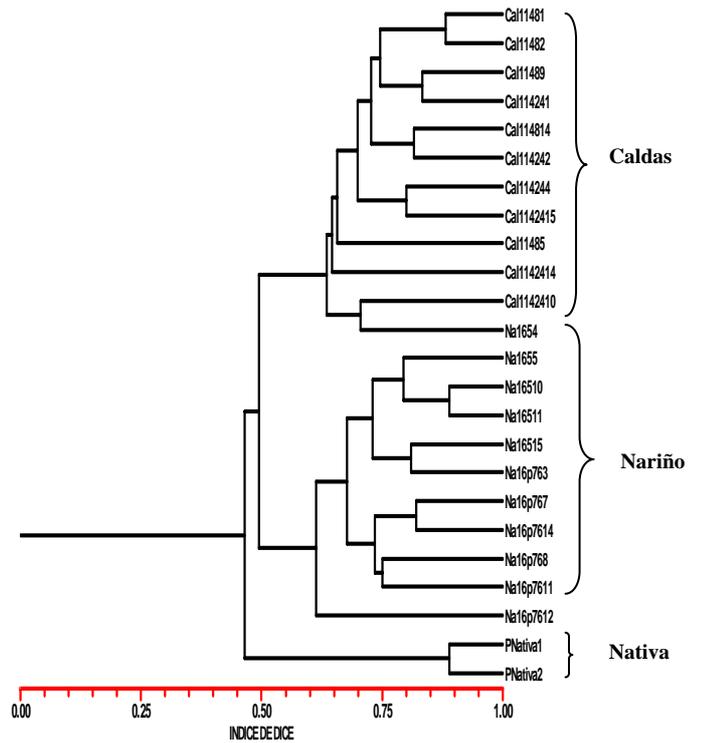


Figura 2. Dendrograma con el índice de similitud y los agrupamientos obtenidos con las accesiones de Aliso evaluadas.

El análisis de correspondencia múltiple, estimó la variación de los individuos en tres dimensiones (ejes x,y,z) (Figura 3).

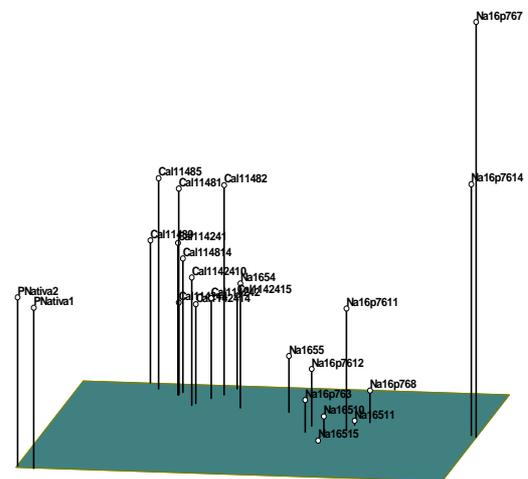


Figura 3. Análisis de Correspondencia Múltiple.

Las tres dimensiones en su conjunto mostraron información similar a la obtenida en el dendrograma, diferenciando en el plano 3 grupos así: 2 grandes grupos en su mayoría conformados por las progenies Caldas y Nariño y un grupo pequeño conformado por los 2 individuos de la población nativa. Este análisis, sin embargo, permite ver diferencias al interior de las progenies, pues muestra 2 individuos de la población de Nariño que se alejan un poco del grupo principal, que comparte la mayoría del genoma analizado. Los individuos de la población nativa son muy similares en

altura y comparten proporcionalmente bandas con ambas progenies.

En cuanto a la caracterización molecular de poblaciones naturales de forestales, son varios los trabajos reportados en los últimos años que utilizan la tecnología AFLP, como Lerceteau y Szmidt (2004) (18), quienes plantean que la información sobre los niveles y distribución de las variaciones genéticas es crucial para los planes de conservación *in situ* y *ex situ*; Greef *et al.* (1998)(13), estudiaron la variación intraespecífica de *Quercus petraea* evaluando la diversidad genética en árboles plus seleccionados para obtener progenies que pudieran ser usadas en programas de reintroducción de la especie en Bélgica; Muluvi *et al.* (1999) (21) realizaron el análisis de la variación genética en *Moringa oleifera* Lam., árbol de variados usos proveniente de India, que fue introducido en África, logrando establecer diferencias significativas entre regiones y poblaciones; Rusell *et al.* (1999) (29), realizaron el estudio sobre la variación genética de *Calycophyllum spruceanum*, en la cuenca amazónica peruana; Sing *et al.* (1999) (30), realizaron un estudio de diversidad genética en *Azadirachta indica*; Lerceteau y Szmidt (1999) (18), realizaron estudios de heredabilidad y diversidad genética de *Pinus sylvestris* L.; Cerón *et al.* (2002) (5), realizaron una estimación de la diversidad genética y un análisis de la variación morfológica del Mangle Negro o Iguanero (*Avicennia germinans* L.) en la Costa Pacífica Colombiana; Coart *et al.* (2002) (6), analizando la diversidad genética en poblaciones de robles (*Quercus petraea* y *Quercus robur*) autóctonas e introducidas en Bélgica; Marulanda *et al.* (2003) (19), estimaron la variabilidad genética en accesiones de *Guadua* spp. encontrando un nivel considerable de variabilidad entre las especies de *Guadua* evaluadas y un nivel menor de diferenciación genética dentro de las accesiones de *G. angustifolia* Kunth.

Los resultados de este proyecto se enmarcan en la investigación genética de aliso en Colombia. En el año 2002, Gutiérrez, evaluó la estabilidad genética de embriones somáticos de *Alnus acuminata*, con marcadores AFLP, de las plantas donantes y de los callos embriogénicos, utilizando dos enzimas de restricción, *Eco* R I y *Mse* I, y 11 combinaciones de primers. De las once combinaciones ensayadas, nueve amplificaron en los 38 individuos implicados en el estudio. Se obtuvo un total de 348 bandas, 195 resultaron polimórficas, es decir un 56% de polimorfismo, este último resultado similar al obtenido en la presente investigación.

3. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La técnica de AFLP se pudo estandarizar para la caracterización molecular de *Alnus acuminata*, y a su vez, hacer un importante aporte a la caracterización de árboles forestales en Colombia.

Se diferenciaron tres grupos genéticos a partir de un 60% de similitud. Los individuos de la progenie Caldas, de la progenie Nariño, y los individuos representantes de la población nativa de Gigante,

Huila, estos últimos, mostraron diferencias claras al compararlos con el resto del grupo.

Los individuos representantes de la población nativa de Gigante, Huila, mostraron diferencias claras al compararlos con el resto del grupo, pero entre ellos son bastante similares pues comparten el 90% del genoma analizado.

La caracterización molecular de las progenies con AFLP mostró que la progenie Caldas es más homogénea genéticamente que la progenie Nariño la cual presenta mayor grado de variación al interior de la progenie.

Teniendo en cuenta los datos moleculares se puede inferir que la forma de conservación de los árboles de Aliso, en los bancos de germoplasma de CENICAFE es adecuada pues la identidad genética entre progenies colectadas en diferentes sitios, se mantiene. Adicionalmente se puede afirmar que no se detectaron duplicados genéticos en la muestra analizada

4. AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al Ministerio del Medio Ambiente por la financiación de la investigación y al Grupo ETIA de CENICAFE por la colaboración prestada durante las colectas del material vegetal, así como los datos de campo suministrados, muy especialmente al Ingeniero Forestal Carlos Mario Ospina, y a los doctores Pilar Moncada y Marco Cristancho por sus sugerencias y aportes. Especial agradecimiento al Magíster Tito Morales por los análisis estadísticos.

5. BIBLIOGRAFÍA

- (1) BADILLA, M.M.V., HIDALGO D., N., GUEVARA B.E. & MURILLO, G. O. 1992. Cultivo In Vitro de Plántulas de Jaúl (*Alnus acuminata*). Tecnología en Marcha.11 (3): 3-9.
- (2) BUDOWSKI, G. y RUSSO, R. 1997. Nitrogen fixing trees and nitrogen fixation in sustainable agriculture: research challenges. Soil Biology and Biochemistry. 29: 5-6, 767-770.
- (3) CARSON, M.J., CARSON, S.D., RICHARDSON, T.E., WALTER, C., WILCOX, P.L., BURDON, R.D., GARDNER, R.C. 1996. Molecular biology applications to forest trees – fact, or fiction? In: Tree improvement for Sustainable Tropical Forestry. Proceedings of the QFRI-UIFRO Conference. Queensland, Australia.
- (4) CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA. CATIE 1995. Jaúl (*Alnus acuminata* spp arguta). Turrialba. Costa Rica, 39 pp.
- (5) CERÓN-S., I., TORO-P., N. y CÁRDENAS-H., H. Estimación de la Diversidad Genética y Análisis de la Variación Morfológica del Mangle Negro o Iguanero (*Avicennia germinans* L.) de la Costa Pacífica Colombiana. En: Universidad Nacional de Colombia, Instituto de Ciencias Naturales, Asociación Latinoamericana de Botánica, Asociación Colombiana de Botánica. Libro de Resúmenes VIII Congreso Latinoamericano de Botánica. Unibiblos. Bogotá. 2002. 608 p.

- (6) COART, E., LAMOTE, V., DE LOOSE, M., VAN BOCKSTAELE, E., LOOTENS, P. y ROLDÁN-R., I. AFLP Markers Demonstrate Local Genetic Differentiation Between Two Indigenous Oak Species (*Quercus robur* L. and *Quercus petraea* (Matt.) Liebl.) in Flemish Populations. *Theor Appl Genet.* 105:431-439. 2002.
- (7) DALE, G. Y CHAPARRO, J. 1996. Integration of molecular markers into tree breeding and improvement programs. En: Dieters, M.J, Matheson, A.C., Nikles, D.G. Harwood, C.E. and Walker, S.M. (eds). *Tree improvement for sustainable tropical forestry.* QFRI –IUFRO. Australia.
- (8) DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* (26):297–302.
- (9) ENRICO, R. J. 1998. Citocininas en la producción de múltiples vástagos en el cultivo in vitro de epicótilos de *Alnus acuminata*. En: *Memorias III Encuentro Latinoamericano de Biotecnología Vegetal.* La Habana. P.93-94
- (10) FEDERACIÓN NACIONAL DE CAFETEROS DE COLOMBIA. CENICAFE. 2000. Ensayo de procedencias y progenies para dos especies forestales tropicales de alto valor comercial. (Resultados marzo 1996 – febrero 2000). Convenio especial de cooperación para investigación forestal con especies nativas FEDERACAFE – MIN. AMBIENTE.
- (11) GARCIA-MAS, J., GRAZIANO, E., ARANZANA, M.J., MONFORTE, A., OLIVER, M., BALLESTER, J., VIRUEL, M.A. y ARUS, P. 2000. Marcadores de ADN: concepto, tipos, protocolos EN: Nuez, F y Carrillo. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. p. 91-151.
- (12) GONZALEZ, C, VILCA, J. 1998. Micropropagación vegetativa in vitro de aliso (*Alnus acuminata*). Asociación civil para la investigación y desarrollo forestal ADEFOR. Cajamarca. Perú. p. 40.
- (13) GREEF, B., TRIEST, L., CUYPER, B., SLYCKEN, J VAN. 1998. Assesment of intraspecific variation in halfsibs of *Quercus petraea* (Matt.) Liebl. "Plus" trees. *Heredity* 81: 3, 284-290
- (14) GUTIÉRREZ, L. 2001. El jaúl (*Alnus acuminata*) un forestal con gran respuesta a la embriogénesis somática. *Tecnología en Marcha.* Vol 14 N° 2: 114-121. Costa Rica.
- (15) GUTIERREZ, L.G. 2002. Embriogénesis somática en *Alnus acuminata* H.B.K. y estudio de la variación somaclonal mediante marcadores moleculares. Tesis Doctoral. Universidad Politécnica de Valencia, España. 180 pp.
- (16) HENRY, R. J. 1997. *Practical applications of plant molecular biology.* Chapman y Hall. Cambridge University Press. Great Britain. 258 p.
- (17) HODSON, E., RODRIGUEZ, C.A. & CHEMAS, A. 1988. Propagación Vegetativa de *Alnus acuminata* H.B.K. por Cultivo de Tejidos Vegetales. *Revista Facultad de Ciencias.* Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá. Colombia. 1(2): 67-77
- (18) LERCETEAU, E. Y SZMIDT, A. E. Properties of AFLP Markers in Inheritance and Genetic Diversity Studies of *Pinus sylvestris* L. *Heredity.* 1999. 82: 3, 252-260.
- (19) MARULANDA, M.L., MÁRQUEZ, M.P., CLAROZ, J.L Y LÓPEZ, A.L. 2004. INFORME PROYECTO "Caracterización molecular y morfológica de tres especies forestales (*Tabebuia rosea*, *Alnus acuminata* y *Cordia alliodora*) mediante la técnica AFLPs". Informe final convenio CENICAFE – UTP. Universidad Tecnológica de Pereira.
- (20) MESÉN, F. 1994. Ensayos de procedencias en especies forestales: establecimiento, manejo, evaluación y análisis. In: *Manual sobre mejoramiento genético forestal con referencia especial a América Central.*
- (21) MULUVI, G. M.; SPRENT, J. I.; SORANZO, N.; PROVAN, J.; ODEE, D.; FOLKARDS, G.; McNICOL, J. W. y POWELL, W. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Analysis of Genetic Variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology* (1999) 8, 463-470.
- (22) MURCIA, C. 1997. Evaluation of Andean alder as a catalyst for recovery of tropical cloud forest in Colombia. *Forestry Ecology and Management* 99, 163- 170.
- (23) MURILLO-O; HATTEMER-H-H. 1997. Inheritance of isozyme variants of *Alnus acuminata* ssp. *arguta* (Schlectendal) Furlow. *Silvae Genetica* 46(1): 51-55.
- (24) NEI, M. & LI, W.H. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleasas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* (76): 5269-5273
- (25) NUEZ, F. Y CARRILLO, J.M., (eds). 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Sociedad española de genética. Sociedad española de ciencias hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia.
- (26) O'MALLEY, D. Y WHETTEN, R. 1997. Molecular markers and forest trees. En: *DNA markers: Protocols, Applications and Overviews,* ed by Caetano, G. y Gresshoff. John Wiley & Sons. New York.
- (27) RESTREPO-URIBE, G., BELLEFLEUR, P., RESTREPO, G. 1996. L'aune des Andes de Colombie: ecologie et identification. *Bois et Forest des Tropiques.* 247, 53-68.
- (28) ROHLF, FJ. 1997. NTSYS-pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.01i. Exeter Software. Setauket. N.Y.
- (29) RUSSELL, J. R.; WEBER, J. C.; BOOTH, A.; POWELL, W.; SOTELO-MONTES, C. y DAWSON, I. K. Genetic Variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, Revealed by Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) Analysis. *Molecular Ecology* (1999) 8, 199-204
- (30) SING., A.; NEGI, MS; RAJAGOPAL, J; BHATIA, S.; TOMAR, UK; SRIVASTAVA, PS; LAKSHMIKUMARAN, M. Assessment of genetic diversity in *Azadirachta indica* using AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics.* 1999, 99: 1-2, 272-279.
- (31) VOS, P., HODGERS, R., BLEEKER, M., REIJANS, M., VAN DE LEE, Y.,
- HORNES, M., FRIJTRS, A., POT, J., PELEMAN, J., KUIPER, M., ZABEAU, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Oxford University Press EN: Nucleic Acids Research.* 23 (21): 4407-4414.