

Estandarización de la técnica molecular de AFLP en palma de aceite tipo Dura (*Elaeis guineensis* Jacq.) y estudio preliminar de caracterización

Standardising Amplified Fragment-Length Polymorphisms (AFLP) for Dura oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) and preliminary molecular characterization studies

Carlos Hernando Galeano¹

Resumen: La palma de aceite (*Elaeis guineensis* Jacq.) desempeña un importante papel en la economía de algunos países tropicales; Colombia ocupa el primer puesto en producción en América Latina y el quinto lugar a nivel mundial. En esta especie el mejoramiento genético busca generar materiales con alta producción de aceite y adaptados a las características edafoclimáticas de las diferentes zonas palmeras. El objetivo del presente trabajo fue estandarizar la técnica de AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphisms*) en materiales Dura del Programa de Fitomejoramiento de CENIPALMA. Al protocolo de AFLP de la casa comercial se le realizaron algunas modificaciones, como el aumento de la concentración del ADN ($270 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) y la dilución 1:10 del producto de la preamplificación. De igual forma, se determinó que para teñir los geles de poliacrilamida con nitrato de plata es necesario usar agua destilada deionizada (Milli Q®). También se realizó un estudio preliminar de caracterización molecular en 12 palmas de los tipos Dura, Ténera y *E. oleifera*; según los agrupamientos hechos según métodos fenéticos y multivariados se encontró que la mayoría de palmas Dura se agrupan según el lugar de colecta, mientras la palma de origen americano se ubica de forma distante al compararla con las palmas de origen africano.

Palabras clave adicionales: Marcadores moleculares, diversidad genética, similaridad genética, ADN.

Summary: Oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plays an important role in some tropical countries' economies; Colombia occupies first place in production in Latin-America and fifth throughout the world. The aim of palm breeding research is producing palm having high oil production, adapted to different climatic condition. Cenipalma is currently using molecular tools which can reduce environmental effect and selection time. This research was aimed at standardising the Amplified Fragment-Length Polymorphisms (AFLP) technique for Dura material from Cenipalma's breeding programme. Modifications were made to the commercial AFLP kit protocol such as increasing initial DNA concentration to $270 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Two amplification product dilutions (1:10 and 1.50) were evaluated, 1:10 dilution being the best for the AFLP technique. It was also found that deionised distilled water was needed for staining polyacrylamide gels with silver nitrate (Milli Q®). A preliminary analysis of genetic diversity was carried out on 12 palms (Dura, Ténera and *E. oleifera*). Clustering and principal coordinate analysis results revealed that most Duras clustered according to where they are collected and that the American palm clustered alone when compared to African palms.

Additional key words: Molecular marker, genetic diversity, genetic similarity, DNA.

Introducción

LA PALMA DE ACEITE (*Elaeis guineensis* Jacq.) es una planta perenne tropical originaria de África Central y Occi-

dental que se cultiva ampliamente en el trópico húmedo (Corley y Tinker, 2003), donde alcanzó un área total en producción cercana a 7,5 millones de hectáreas en el año 2002, de las cuales Colombia participó con 145.027

Fecha de recepción: 15 de diciembre de 2004
Aceptado para publicación: 27 de mayo de 2005

¹ Investigador Asistente, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira. e-mail: chgaleanom@unal.edu.co

ha distribuidas en cuatro regiones productoras. Colombia es el quinto productor a nivel mundial y el primero en el continente americano, con una producción cercana a 577.117 t que incluye los aceites de palma y de palmiste (Fedepalma, 2003).

Los programas de mejoramiento en palma de aceite están orientados hacia el aumento de la producción de racimos por palma y, por lo tanto, al incremento de la producción de aceite. En Colombia, además de este objetivo, deben identificarse materiales que presenten buena adaptación a las zonas agroecológicas palmeras y que sean resistentes a enfermedades y plagas limitantes del cultivo (Ayala y Gómez, 2000). Como estrategia, los programas de mejoramiento se basan en la selección de materiales tipo Dura (progenitor femenino) y plantas Pisíferas (progenitor masculino) para la posterior evaluación de progenies por alta producción de aceite.

El Centro de Investigación en Palma de Aceite (CENIPALMA) busca consolidar un Programa de Fitomejoramiento de palmas tipo Dura presentes en diferentes plantaciones del país. De esta manera, se contribuirá a evitar la ‘erosión genética’ y se generarán plantas madre con una combinación deseable de genes que confieran óptima adaptación a las condiciones de las zonas productoras colombianas (Rey *et al.*, 2003).

Para cumplir con estos objetivos es esencial conocer la variabilidad genética existente dentro de la especie o especies intercruzables, a fin de identificar individuos con características deseables y la fuente de genes disponible para el mejoramiento del cultivo, además de obtener la mejor adaptación con los más altos rendimientos. Con el fin de planificar cruzamientos, se están utilizando marcadores moleculares tipo RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*; Polimorfismo en el ADN Amplificado Aleatoriamente) y AFLP (*Amplified Fragment-Length Polymorphisms*, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) como herramientas adicionales al registro individual de producción y de medidas vegetativas (Villegas *et al.*, 2000; Rocha, 2002).

Los marcadores moleculares son secuencias de ADN que se han constituido en herramientas valiosas para la detección y el uso de la diversidad genética, con su consecuente aplicación en programas de selección genética de plantas, animales y microorganismos. Los polimorfismos de ADN pueden ser detectados mediante técnicas moleculares, algunas de las cuales han sido em-

pleadas en palma de aceite en el análisis de variabilidad genética y el establecimiento de relaciones filogenéticas (Billotte *et al.*, 2001), desarrollo de mapas de ligamiento (Mayes *et al.*, 1997), señalización y seguimiento de genes de interés (Árias y Rocha, 2004; Rance *et al.*, 2001).

La técnica de AFLP combina la especificidad, la resolución y el poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y la facilidad para detectar polimorfismos vía PCR (Vos *et al.*, 1995). Con esta técnica se han obtenido un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariotas y eucariotas. En palma se han utilizado en estudios de diversidad genética del género *Elaeis* (Barcelos *et al.*, 2000; Barcelos, 1998), estudios de ligamiento genético a características como grosor de cuesco (Billotte *et al.*, 2001), detección de variación somaclonal (Matthes *et al.*, 2001) y estudios de progenie (Rajinder *et al.*, 1998).

El objetivo de este trabajo fue estandarizar la técnica de AFLP en materiales Dura bajo las condiciones del laboratorio de biología molecular de CENIPALMA y realizar un estudio preliminar de caracterización molecular de palmas Dura, Ténera y *E. oleifera*. Estos materiales presentan características de interés para programas de mejoramiento genético y la técnica orientará la selección de palmas Dura.

Materiales y métodos

Material vegetal

El material vegetal utilizado para la estandarización de AFLP correspondió a palmas Dura de la Zona Central (departamento de Santander, municipio de Puerto Wilches, Plantación Agropecuaria Monterrey) que presentaron altos registros de producción; las muestras consistieron en foliolos jóvenes y sanos de la hoja 17. Posteriormente, se colectaron otros materiales de palma de aceite de las Zonas Central y Norte (departamento del Atlántico, municipio de Fundación, Plantación Padorno) de los cuales se seleccionaron 12 para realizar una evaluación preliminar de la diversidad genética de las muestras, las cuales comprendían materiales de los tipos Dura, Ténera y *E. oleifera* (Tabla 1).

Extracción del ADN genómico

La metodología se realizó de acuerdo con el protocolo del laboratorio de marcadores moleculares de CENIPALMA

Tabla 1. Material vegetal utilizado para la estandarización y el estudio de diversidad.

	Plantación	Código de laboratorio	Código de campo	Tipo de palma
Palmas para la estandarización	Monterrey	AL 143	P1 (2F4-6)	Dura
	Monterrey	AL 144	P3 (4C4-26)	Dura
	Monterrey	AL 145	P5 (2A5-17)	Dura
	Monterrey	AL 146	P6 (5Z5-13)	Dura
	Monterrey	AL 147	P2 (10B5-22)	Dura
	Monterrey	AL 148	P4 (1A5-20)	Dura
Palmas para el análisis preliminar de diversidad	Monterrey	AL 149	2F4	Dura
	Monterrey	AL 150	2F4	Dura
	Monterrey	AL 151	2F4	Dura
	Padorno	CG 207	25	Dura
	Padorno	CG 208	25	Dura
	Padorno	CG 209	25	Dura
	La Pepilla	CG 240	699	Ténera
	La Pepilla	CG 241	T-01	Ténera
	La Pepilla	CG 242	T-02	Ténera
	La Pepilla	CG 243	T-03	Ténera
	La Cabaña	CG 252	Noli	E. oleifera

(Rocha *et al.*, 2003). El tejido foliar fue pulverizado con ayuda de nitrógeno líquido y en un tubo Ependorff de 1,5 mL se tomó una cantidad aproximada de 500 mg de tejido molido. Luego se agregaron 1,2 mL de solución de extracción caliente (Tris HCl 100 mM, EDTA 50 mM, NaCl 500 mM, β -mercaptoetanol 10 mM y PVP 1% [p/v]) y posteriormente se agregaron 85 μ L de SDS (dodesil sulfato de sodio) al 20%. Los tubos se incubaron en baño maría a 65°C durante 30 min y luego se agregaron 390 μ L de acetato de potasio 5 M. La mezcla se centrifugó a 12.500 $\times g$ durante 15 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo, al cual se adicionó 1 mL de isopropanol frío; la mezcla se incubó a -20°C durante toda la noche. Después se centrifugó a 25.000 $\times g$ durante 30 min y se desechó el líquido teniendo cuidado de no perturbar el botón de ADN, el cual se lavó con 2 mL de etanol al 70% para luego centrifugarlo a 25.000 $\times g$ durante 3 min. Finalmente, se dejó secar el botón a temperatura ambiente y se le adicionaron 350 μ L de solución TE-ARNasa (10 mM de Tris HCl a pH 8,0; 1 mM de EDTA a pH 8,0; 5 mg \cdot mL⁻¹ de ARNasa) y se incubó a 37°C durante 15 min. El ADN obtenido se almacenó a 4°C para su posterior utilización.

Para la cuantificación del ADN se utilizó un método comparativo teniendo como patrón de referencia un ADN genómico de tomate de concentración conocida. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,7% (p/v) en donde se colocó el ADN de tomate a diferentes

concentraciones, el cual se comparó con el ADN de las muestras. La concentración de las muestras se determinó según la intensidad de fluorescencia emitida por el bromuro de etidio.

Técnica de AFLP

Para la técnica molecular AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*, Polimorfismos de Longitud de Fragmentos Amplificados) se utilizó el *kit AFLP Analysis System I*[®] siguiendo el protocolo del fabricante con algunas modificaciones. La digestión se realizó con las enzimas *EcoR I/Mse I* (1,25 U \cdot μ L⁻¹) al incubarlas con el ADN (270 ng) durante 2 h a 37°C. A los fragmentos de restricción se las adicionó 24 μ L de una mezcla de adaptadores que, junto con la enzima T4 DNA ligasa, se unieron a los extremos cohesivos dejados por las enzimas de restricción. Para la preamplificación se tomaron 5 μ L de una dilución 1:10 del resultado de la ligación, y se agregaron 40 μ L de la mezcla de cebadores con un nucleótido seleccionante (+1), 5 μ L de buffer 10X con Mg, y 1 μ L de Taq DNA polimerasa. El termociclador se programó a 94°C durante 30 segundos (s), 56°C durante 60 s y 72°C durante 60 s, por 20 ciclos. El resultado de esta PCR se corroboró con una electroforesis en gel de agarosa al 1% y posteriormente se realizó una dilución 1:10.

Para la amplificación se tomaron 5 μ L de la dilución, 5 μ L del mix 1 (primers +3 y dNTP's) y 10 μ L del mix 2 (taq polimerasa, buffer 10X) según protocolo del fabricante. El termociclador se programó a 94°C durante 30 s para denaturar la molécula, 65°C durante 30 s para alinear los cebadores y 72°C durante 60 s para la polimerización. Posteriormente, la temperatura de alineamiento bajó 0,7°C en cada ciclo durante 12 ciclos (*touch down*) y continuó con 94°C durante 30 s, 56°C durante 60 s y 72°C por 60 s, a lo largo de 23 ciclos.

El producto de la amplificación se observó en una electroforesis en gel de poliácridamida al 5% y 8 M de úrea a 100 W durante dos horas, o hasta que la banda de xilene-cyanol llegara a la parte inferior del gel.

Para la tinción se colocó el gel en una solución ácido acético al 10% durante 20 minutos (min), luego se lavó con agua destilada deionizada dos veces durante 1 min cada vez. Posteriormente se incubó en una solución de tinción (2 g de AgNO₃, 3 mL de formaldehidol 37% en

2 L de agua) durante 30 min. El exceso de plata se retiró lavando con agua destilada deionizada durante 10 seg. Después, se sumergió en la solución de revelado (60 g de Na₂CO₃, 3 mL de formaldehído al 37% y 400 µL de tiosulfato de sodio [10 mg · mL⁻¹] en 2 L de agua) durante 5 a 10 min hasta visualizar las bandas. Finalmente, el gel se colocó a una solución de ácido acético al 10% para detener la reacción y se lavó con agua destilada deionizada.

Análisis de datos

Las bandas polimórficas en el gel fueron contadas visualmente con la ayuda de un transiluminador de luz blanca; una banda se considera polimórfica si está presente al menos en un individuo y ausente en los otros. Se generó una matriz binaria en la que las bandas fueron contadas como '1' presente y '0' ausente. La matriz binaria de datos fue convertida a una matriz de similaridad de acuerdo con la definición de Nei y Li (1979):

$$S_{ij} = 2a / (2a + b + c)$$

Donde S_{ij} es la similitud entre los individuos i y j; a es el número de bandas presentes en ambos i y j; b es el número de bandas presentes en i y ausentes en j; y c es el número de bandas presentes en j y ausentes en i. El dendograma fue construido a partir de la matriz de similaridad agrupando los datos con el método UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Arithmetic Average*). El coeficiente de correlación cofenética fue calculado entre la matriz de similaridad y la matriz cofenética. El análisis de coordenadas principales se basó en la matriz de similaridad utilizando los algoritmos DCENTER y EIGEN. Todos los datos se analizaron con el software NTSYS-pc® versión 2.11L (Rohlf, 2000).

Resultados y discusión

Extracción y cuantificación

El protocolo de extracción de ADN difirió del utilizado previamente en palma (Rocha, 2002), el cual resultaba dispendioso y costoso, y hacía difícil la extracción de un buen número de muestras. Uno de los cambios fue el uso de SDS (dodecil sulfato de sodio), un detergente aniónico cuya función principal es la de solubilizar proteínas y membranas; su utilización para una óptima extracción de ADN a partir de pequeñas cantidades de tejido foliar se reporta en varios protocolos (Quenzar *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2002). A fin de prevenir la presencia de polifenoles que pueden unirse mediante enlaces covalentes a proteínas y ácidos nucleicos y generar un ADN de baja calidad, se recurrió –además del PVP y el SDS–, al β-mercaptoetanol por su función inhibitoria de la oxidación de compuestos fenólicos (Li *et al.*, 2002). Este procedimiento arrojó muy buenos resultados pues fue posible obtener ADN de alta calidad (Figura 1).

Además, el método de cuantificación citado permite determinar la calidad del ADN extraído e identificar compuestos como ARN o proteínas que pueden interferir en las reacciones posteriores, acarreando problemas como una insuficiente digestión por parte de las enzimas en el caso de AFLP. La cuantificación del ADN mostró cantidades bastante diferentes, dependiendo de la calidad (fisiológica y sanitaria) del foliolo utilizado. En la Figura 1 se observa que el ADN no tiene impurezas (ARN o proteínas) y que las bandas no presentan degradación por parte de las ADNasas. Estas características son las ideales para iniciar el protocolo de AFLP, ya que se necesita ADN de alta pureza para garantizar la digestión completa por parte de las enzimas de restricción en todas las muestras y así no tener problemas en la interpretación de los polimorfismos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Determinaciones electrofotométricas sobre la cantidad necesaria de ADN para iniciar

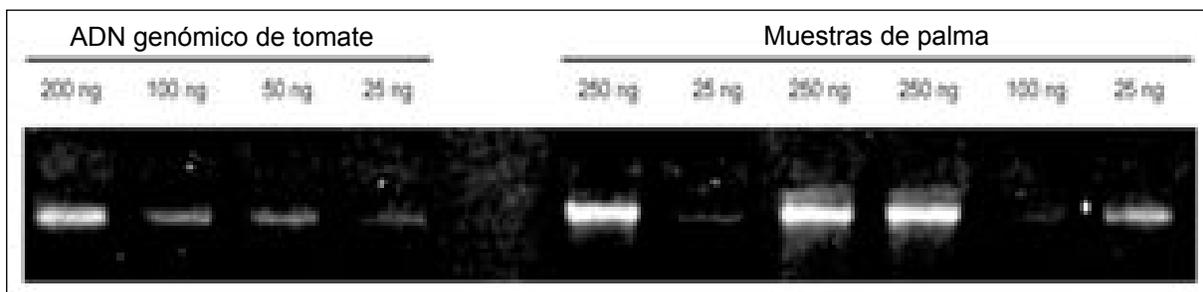


Figura 1. Cuantificación del ADN mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7 % (p/v).

trabajos con AFLP son reportadas por Ubi *et al.* (2003) al correr alícuotas de ADN en gel de agarosa al 8% (p/v) y compararlas con cadenas no digeridas del fago Lambda.

Técnica de AFLP

La primera modificación implementada fue la cantidad de ADN con que se inició la digestión enzimática al utilizar 270 ng, 20 ng más de lo sugerido por la casa comercial. Modificaciones similares se han reportado en papa (McGregor *et al.*, 2002) especie de la que utilizaron entre 300 y 400 ng de ADN; de igual forma en café (Anthony *et al.*, 2002), para lo cual se usaron alícuotas de 500 ng de ADN genómico; ello señala que el aumento de la concentración del ADN inicial genera resultados óptimos. Por otra parte, el incremento de la cantidad de ADN al inicio del protocolo de AFLP ha sido estudiado por Zhu *et al.* (1998) y Vos *et al.* (1995) quienes evaluaron cantidades entre 0,2 µg y 1,0 µg y determinaron que los perfiles de las bandas no son significativamente sensibles a la concentración inicial del ADN.

Posteriormente, el producto de preamplificación se diluyó 1:50 según las recomendaciones del manual, y a 1:10 según Julier *et al.* (2003) para posteriormente realizar la reacción de amplificación con los cebadores +3. Por último, los productos de PCR +3 se observaron en una electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% sobre el cual se evaluaron las dos diluciones de la preamplificación (1:10 y 1:50) (Figura 2A); para la tinción se utilizó agua de consumo humano (Santa Clara®). En la Figura 2A se evidencia que la concentración 1:50 recomendada por el fabricante de AFLP's no fue óptima para la palma, mientras que en la concentración 1:10 se pueden ver un buen número de las bandas. Este resultado es coherente con las modificaciones que se realizan al protocolo de AFLP en los trabajos de Rajinder *et al.* (1998) y Julier *et al.* (2003). El ajuste en la dilución del producto de la preamplificación puede realizarse de 1 a 50 veces, dependiendo de la intensidad de las bandas (Zhu *et al.*, 1998), lo que permite obtener mejor resolución en los geles.

El otro problema que se observa en la Figura 2A es la deficiente calidad de la tinción cuando se utiliza agua

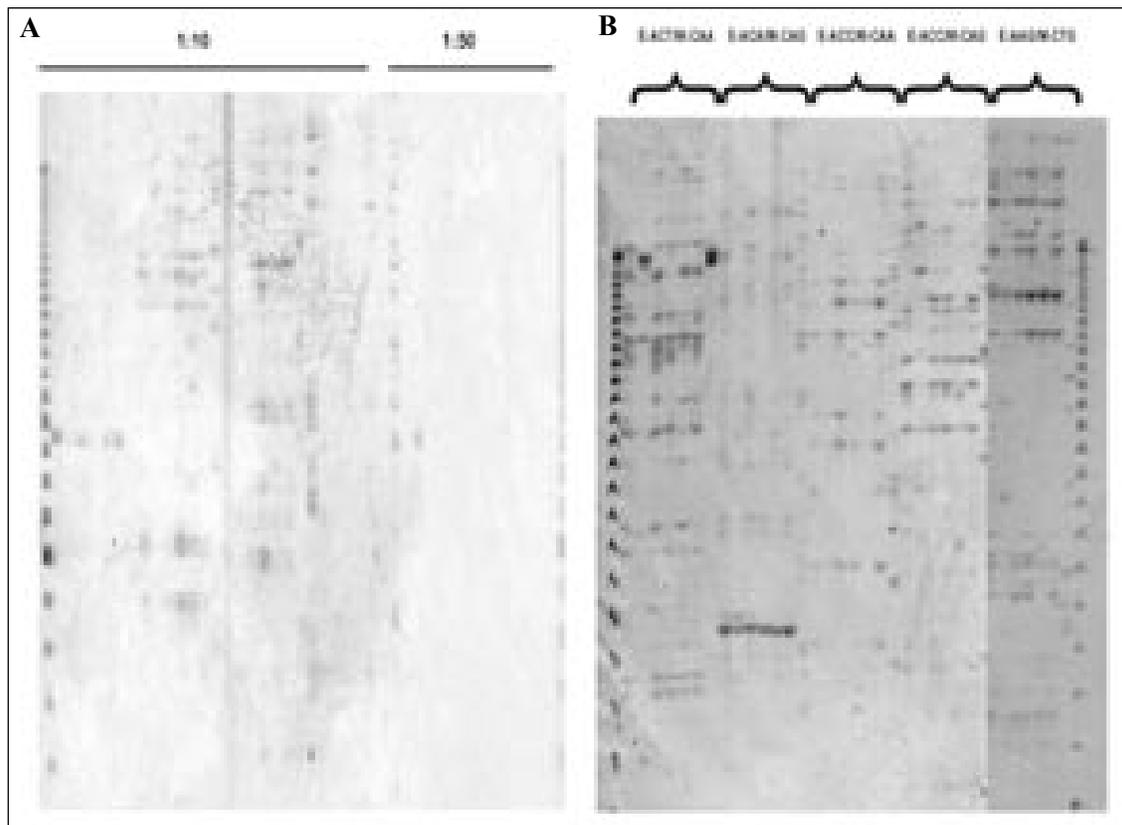


Figura 2. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 5% y 8M de urea. A) Evaluación de dos diluciones del producto de preamplificación. B) Perfil de bandas de seis materiales Dura con cinco combinaciones de cebadores.

de consumo humano que tiene contaminantes, especialmente halógenos y/o iones metálicos, que generan una baja intensidad de las bandas, razón por la cual se recomienda la utilización de agua destilada y deionizada para tal fin.

Por lo anterior, se evaluaron tres tipos de agua: de consumo humano, destilada y Milli Q[®]. Las dos primeras generaron precipitación del carbonato de potasio, al igual que turbidez en la solución con nitrato de plata. El resultado final del uso de este tipo de agua son geles manchados con bandas muy tenues. Los análisis de conductividad eléctrica corroboraron los resultados, al encontrar mayor cantidad de sales en el agua de consumo humano (190 µmhos), y reducida cantidad de las mismas en el agua Milli Q[®] (1,7 µmhos), opción que mostró mejor desempeño para la tinción de los geles. En la Figura 2B se puede observar un buen número de bandas polimórficas, cerca de 30 a 40 entre los 100 y 800 pb, un resultado similar al reportado por Rajinder *et al.* (1998) en palma de aceite.

Estudio preliminar de caracterización molecular

En las 12 muestras evaluadas (Tabla 1) se detectaron un total de 134 bandas polimórficas con el uso de cuatro combinaciones de cebadores (Tabla 2). La combinación de cebadores E-ACA/M-CAG presenta el mayor número de polimorfismos con 68 bandas polimórficas, a diferencia de la combinación E-ACC/M-CAG que muestra tan sólo 6 bandas polimórficas; la alta cantidad de bandas polimórficas es una primera indicación de la variación genética presente en los individuos evaluados. Estos resultados son consistentes con los polimorfismos detectados en palma por Maizura & Rajanaidu (2003) quienes usaron ocho combinaciones de cebadores, generando un total de 228 bandas polimórficas. De igual forma, Purba *et al.* (2000) reportaron la generación de 96 bandas polimórficas utilizando cinco combinaciones de cebadores.

Tabla 2. Bandas polimórficas obtenidas por combinación de cebadores.

Cebadores	No. de bandas
E-ACT / M-CAA	24
E-ACA / M-CAG	68
E-ACC / M-CAA	36
E-ACC / M-CAG	6
Total	134

La variación genética entre los 12 materiales fue estimada usando el coeficiente de similaridad sugerido por Nei & Li (1979), el cual se recomienda para el análisis de datos de marcadores dominantes, pues da más importancia a las bandas compartidas o coincidentes (Zeid, 2003). En la matriz de similaridad (Tabla 3) se evidencian relaciones muy cercanas entre las palmas Ténera que mostraron índices de similaridad de 0,667 (GC 243 y GC 242); por otra parte, se encuentran bajos valores de similaridad (0,074 a 0,2) al comparar la palma de origen americano (GC 252) con el resto de palmas de origen africano.

Tabla 3. Matriz de similaridad.

	AL 149	AL 150	AL 151	GC 207	GC 208	GC 209	GC 240	GC 241	GC 242	GC 243	GC 252
AL149	1										
AL150	0,557	1									
AL151	0,545	0,607	1								
GC 207	0,333	0,37	0,4	1							
GC 208	0,354	0,296	0,406	0,286	1						
GC 209	0,5	0,541	0,655	0,289	0,278	1					
GC 240	0,466	0,37	0,425	0,3	0,49	0,267	1				
GC 241	0,4	0,549	0,622	0,371	0,271	0,54	0,371	1			
GC 242	0,517	0,526	0,588	0,366	0,254	0,625	0,39	0,478	1		
GC 243	0,442	0,465	0,507	0,222	0,291	0,617	0,328	0,328	0,667	1	
GC 252	0,087	0,2	0,122	0,162	0,276	0,109	0,244	0,098	0,115	0,074	1

El análisis de agrupamientos genera un dendrograma (Figura 3) con una correlación cofenética alta ($r = 0,92$), lo cual indica que el fenograma representa fielmente los valores de la matriz de similitud (Crisci y López, 1983). En el árbol se puede evidenciar dos grandes agrupamientos: el primero reúne todas las palmas tipo Dura colectadas en la Zona Central (Plantación Monterrey), con excepción de CG 209, la cual se colectó en la Zona Norte, junto con algunas tipo Ténera. En el segundo grupo se ubican las restantes palmas Dura de la zona norte, junto con otras Ténera.

El agrupamiento de las palmas tipo Dura colectadas en la Zonas Central y Norte con las palmas tipo Ténera, se puede explicar al conocer el origen híbrido de las palmas Ténera, ya que provienen del cruce de Dura x Pisífera. Similares agrupamientos de materiales Dura con Ténera son reportados en los trabajos de Maizura y Rajanaidu (2003).

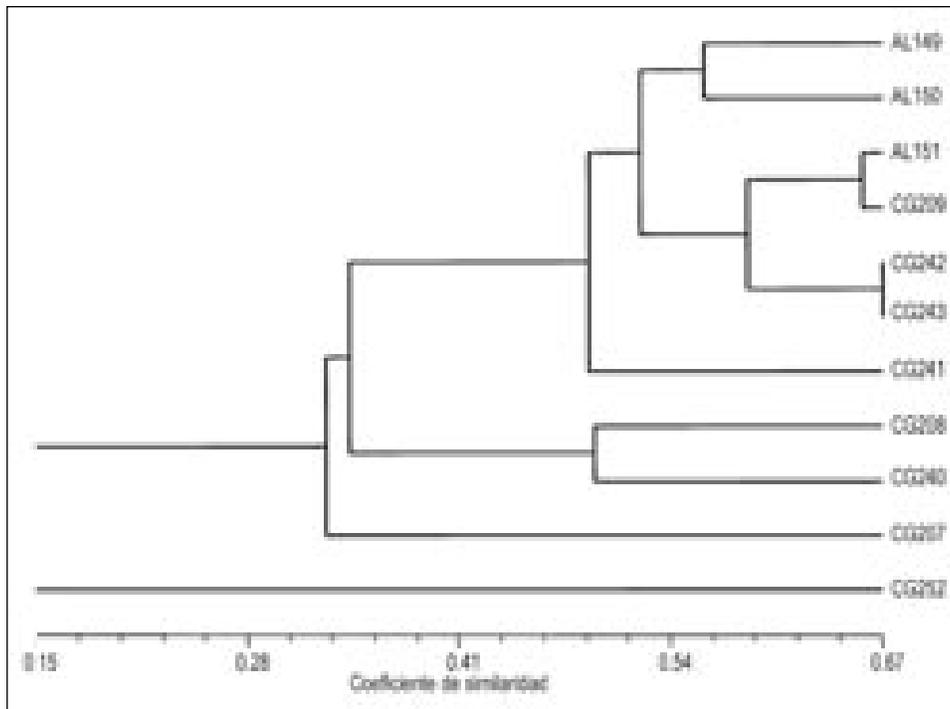


Figura 3. Dendrograma generado por el agrupamiento UPGMA de la matriz de similitud.

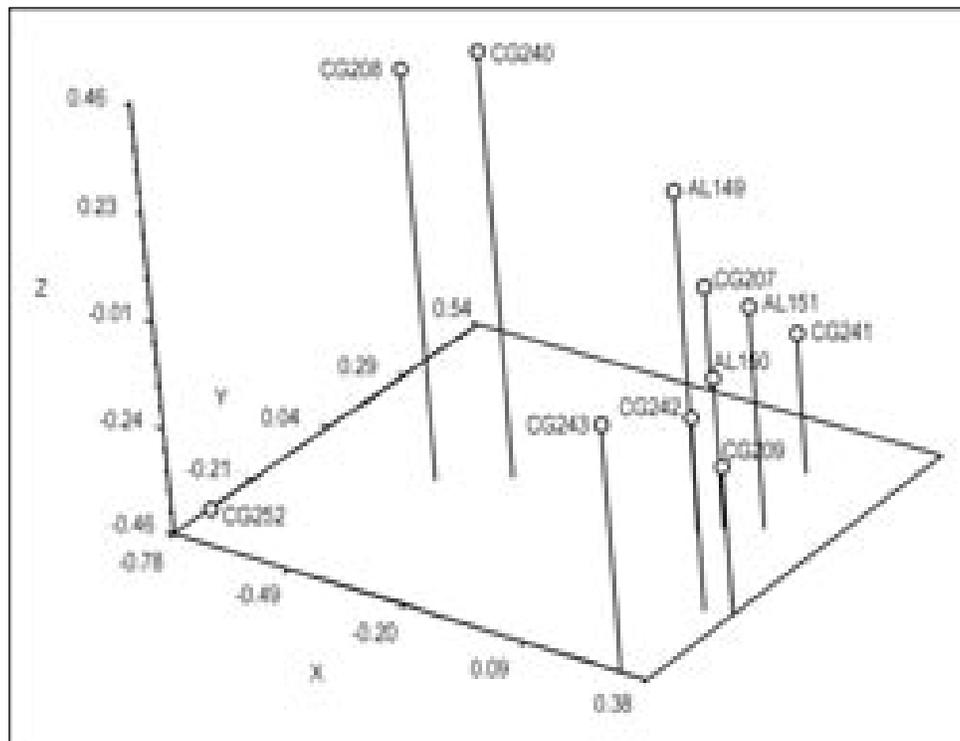


Figura 4. Diagrama de coordenadas principales basado en la matriz de similitud.

Los resultados del análisis de coordenadas principales de la Figura 4, muestran la distribución de las muestras en tres coordenadas las cuales explican el 50,3 % de la variación. En dicha figura se puede corroborar de forma más precisa los agrupamientos evidenciados en el dendrograma de la Figura 3, lo que permite afirmar que existe una interesante diferenciación genética en los individuos evaluados.

Por último, en las Figuras 3 y 4 se puede observar que la palma de aceite de origen americano (GC 252) se agrupa aparte de las palmas de origen africano. Resultados similares son reportados en palma de aceite por Bilotte *et al.* (2001) y Barcelos *et al.* (2002) quienes usaron microsatélites, y AFLP y RFLP, respectivamente. Por el contrario, solamente el trabajo publicado por Arias y Rocha (2004) reporta una corta distancia genética entre la palma americana y la africana generando un dendrograma donde ambas especies se mezclan y evidenciando que los marcadores microsatélites, utilizados en dicho trabajo, no pueden distinguir entre *E. oleifera* y *E. guineensis* o problemas el etiquetamiento del material.

Conclusiones

Para los objetivos del Programa de Fitomejoramiento de CENIPALMA la diferencia genética existente entre los grupos de las palmas tipo Dura es de gran interés, cuando se busca seleccionar materiales tipo Dura que sirvan para realizar cruzamientos

DxD y así generar progenies segregantes con variabilidad genética que puedan brindar más ganancia en la selección de palmas madre. Además, la viabilidad de los cruzamientos interespecíficos en palma hace que la especie *E. oleifera* constituya una de las estrategias para aumentar la base genética en los programas de mejoramiento de palma de aceite en Colombia.

Agradecimientos

Agradezco a CENIPALMA por acogerme como tesista y brindarme el apoyo logístico y económico necesario para esta investigación. Así mismo, a los Doctores Pedro Rocha y Leonardo Rey por la dirección, consejo, corrección y ayuda en la elaboración de este trabajo. De igual forma, al profesor Oscar Oliveros de la Universidad Nacional por sus correcciones y sugerencias.

Literatura citada

Anthony F.; M.C. Combes; C. Astorga; B. Bertrand; G. Graziosi y P. Lashermes. 2002. The origin of cultivated *Coffea arabica* varieties revealed by AFLP and SSR markers. *Theoretical Applied Genetics* 104(5), 894-900.

Arias, D. y P. Rocha. 2004. Análisis de la diversidad genética en materiales tolerantes y susceptibles a la pudrición de cogollo en palma de aceite mediante marcadores moleculares. *Palmas* 25(3), 11-27.

Ayala, L.; P. Gómez y C. Durán. 2000. Selección de progenitores Dura adaptados a las condiciones del Magdalena Medio colombiano. *Palmas* 21(1), 25-34.

Barcelos, E. 1998. Étude de la diversité génétique du genre *Elaeis* (*E. oleifera* (Kunth) Cortés et *E. guineensis* Jacq.) par marqueurs moléculaires (RFLP et AFLP). Thèse de Docteur, Université de Montpellier II, Montpellier. 137 p.

Barcelos, E.; P. Amblard; J. Berthaud y M. Seguin. 2000. The genetic diversity of the American oil palm *Elaeis oleifera* (Kunth) Cortés, revealed by nuclear RFLP markers. *Pesq. Agropec. Brasileira* 37(8), 1105-1114.

Billotte, N.; A.M. Rusterucci; E. Barcelos; J.L. Noyer; P. Amblard y F.C. Baurens. 2001. Development, characterization and across-taxa utility of oil palm (*Elaeis guineensis*) microsatellite markers. *Genome* 44, 413-425.

Corley, R.H.V. y P.B. Tinker. 2003. *The oil palm*. Fourth edition. Blackwell, New York. 562 p.

Crisci, J. y M. López. 1983. *Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica*. Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos OEA. Washington, D.C. 120 p.

FEDEPALMA. 2003. *Anuario estadístico: La agroindustria de la palma de aceite en Colombia y el mundo*. Fedepalma, Bogotá.

Ferreira, M. y D. Grattapaglia. 1998. *Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético*. EMBRAPA, Brasilia. 221 p.

Julier, B.; S. Flajoulot; P. Barre; G. Cardinet; S. Santoni; T. Huguet y C. Huyghe. 2003. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers. *BMC Plant Biology* 3(9). En: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/3/9>; consulta: mayo 2005.

Li, Y.; Z. Su y F. Chen. 2002. Rapid extraction of genomic DNA from leaves and bracts of bove tree (*Davidia involucrata*). *Plant Molecular Biology Reporter* 20, 185a-185d.

Maizura, I. y N. Rajanaidu. 2003. Preliminary results on AFLP screening of the Malaysian advanced oil palm breeding population. *Proceeding of the PIPOC 2003 International Palm Oil Congress*. Kuala Lumpur, Malaysia. pp. 150-160.

Matthes, M.; R. Singh; S. Chean y A. Karp. 2001. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLP's with methylation-sensitive enzymes. *Theoretical and Applied Genetics* 102, 971-979.

Mayes, S.; P. Jack; D. Marshall y R. Corley. 1997. The construction of a RFLP linkage map for oil palm. *Genome* 40, 116-122.

McGregor, C.; R. Treuren; R. Hoekstra y T. Hintum. 2002. Analysis of the wild potato germplasm of the series *Acaulia* with AFLP's: implications for *ex situ* conservation. *Theoretical and Applied Genetics* 104, 146-156.

Nei, M. y W. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science* 76, 5269-5273.

Purba, A.R.; J.L. Noyer; L. Baudouin; X. Perrier; S. Hamon y P.J. Lagoda. 2000. A new aspect of genetic diversity of Indonesia oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) revealed by isoenzyme and AFLP markers and its consequences for breeding. *Theoretical and Applied Genetics* 101, 956-961.

Qunzar, B.; C. Hartman; A. Rode y A. Benslimane. 1998. Date palm mini-prepartin without liquid nitrogen. *Plant Molecular Biology Reporter* 16, 263-269.

Rajinder, S.; C. Suan-Choo y A. Rahimah. 1998. Generation of molecular markers in oil palm (*Elaeis guineensis*) using AFLP analysis. *Plant Biotechnology* 20, 26-27.

Rance, K.A.; S. Mayes; Z. Price; P.L. Jack y R.H.V. Corley. 2001. Quantitative trait loci for yield components in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Theoretical and Applied Genetics* 103, 1302-1310.

Rey, L.; I. Ochoa; W. Delgado y P. Rocha. 2003. *Colecta de material genético de palma Nolí *Elaeis oleifera* [H.B.K] Cortes en el Trapecio Amazónico*. Ceniavances 101, 1-4.

Rocha, P. 2002. *Teoría y práctica para la extracción del ADN de palma de aceite*. *Palmas* 23, 9-17.

Rocha, P.; D. Arias y C. Galeano. 2003. *Manual de protocolos del laboratorio de marcadores moleculares*. CENIPALMA, documento interno de trabajo.

Rollh, F.J. 2000. *NTSYS-PC®. Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Software. New York.

Ubi, E.; R. Kölliker; M. Fujimori y T. Komatsu. 2003. Genetic diversity in diploid cultivars of rhodesgrass determined on the basis of Amplified Fragment Length Polymorphism markers. *Crop Science* 43, 1.516-1.552.

Villegas, V.; C. Durán y S. Beebe. 2000. *Caracterización molecular de materiales Dura*. *Palmas* 21, 35-40.

Vos, P.; R. Hogers; M. Bleeker; M. Reijjas y T. Lee. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23, 4407-4414.

Zeid, M. 2003. *Analysis of genetic diversity based on molecular markers (AFLP) and the heterosis in faba bean (*Vicia faba* L.)*. Ph.D. thesis. Faculty of Agricultural Sciences, Georg August University, Göttingen, Germany.

Zhu, J.; M. Gale; S. Quarrie; M. Jackson y G. Bryan. 1998. AFLP markers for study of rice biodiversity. *Theoretical and Applied Genetics* 96, 602-611.