

UNIVERSIDAD NACIONAL SAN AGUSTÍN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y AGROPECUARIAS

ESCUELA DE BIOLOGÍA



Análisis de Diversidad Genética y Distribución Espacial del Germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz (yuca) en Ucayali-Perú, mediante marcadores SSR.

Tesis presentada por la Bachiller:
YENY NATALI AQUINO VILLASANTE
Para optar el título profesional de Biólogo.

AREQUIPA-PERÚ

2006

*El presente trabajo de Tesis “Análisis de Diversidad Genética y Distribución Espacial del Germoplasma de **Manihot esculenta** Crantz (yuca) de Ucayali-Perú, Mediante el uso de Marcadores SSR”, ha sido realizado en la Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología – SUDIRGEB , de la Dirección de Investigación Agraria – DIA, del Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria - INIEA; en la Sede Central del INIEA en Lima dentro del marco del Proyecto “Modelos de diversidad y de erosión genética de cultivos tradicionales en Perú: Asesoría rápida y detección temprana de riesgos usando las herramientas de GIS” Auspiciado por la Cooperación Técnica Alemana (GTZ), Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI) bajo el asesoramiento de los especialistas Daniel Andrade y Milusqui Verastegui.*

A Dios por su presencia en todo momento de mi vida.

A mis padres: Luis Alfredo y Eduarda.

A mis hermanos.

A mi mejor amigo Eudosio.

Agradecimientos

Al Doctor Luigi Guarino, coordinador inicial del proyecto “Modelos de Diversidad y Erosión Genética de Cultivos Tradicionales en el Perú: asesoría rápida y detección temprana de riesgos usando la herramienta de GIS”, por haberme dado la oportunidad de ser parte de su equipo mediante la tesis, también al Doctor William Shelderman, por su apoyo y confianza en que el trabajo se llegaría a concretar. Asimismo, a todo el personal encargado de ejecutar el mencionado proyecto en el Perú.

Al Doctor Rolando Estrada, jefe de la Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB) del Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), quien hizo posible que se lleve a término esta tesis con sus consejos profesionales y su ayuda para culminar la tesis.

A la Doctora María Rosario Valderrama, asesora de tesis, por sus consejos, observaciones y su apoyo incondicional para que este trabajo se conduzca de la mejor forma posible, a pesar de la distancia física y del tiempo transcurrido.

Al personal del laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB-INIEA, por haberme brindado las facilidades, apoyo técnico y profesional para la ejecución de este trabajo.

Al Centro Internacional de la Papa (CIP), al Doctor Marck Ghislain por abrir las puertas de los laboratorios y permitir el desarrollo parte de la tesis en el área de Recursos Genéticos del mencionado centro, así también a la Magíster Genoveva Rossel quien se mostró más que una amiga al facilitarnos la estadía temporal, y también por compartir su conocimiento. Así mismo a los técnicos y estudiantes del área que me apoyaron en la parte técnica de laboratorio.

A todo el personal de la SUDIRGEB, por hacer una experiencia satisfactoria y grata el desarrollo de la tesis. A todas aquellas personas que actualmente laboran y de la misma manera a las que ya no: Doctora Noemí Zúñiga, Doctor Santiago Pastor, Biólogo Daniel Andrade, Magíster Milusqui Verástegui, etc., porque cada uno no sólo es parte de este trabajo sino también son parte de mi formación laboral. Gracias por toda su enseñanza y apoyo, y de manera especial a aquellas que se involucraron no sólo en trabajo arduo de

laboratorio, gabinete y otros, sino también de manera personal, animándome, y a veces llamándome la atención para que todo este trabajo salga adelante.

No olvido a todos mis amigos: Fernando, Nedy, Rocio Hualla, Rocio Silvestre, Julian y todos aquellos quienes estuvieron compartiendo momentos de alegría, tristezas y anécdotas diarias. Gracias por escucharme, tenerme en cuenta y hacerme parte de sus vidas.

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	xi
ÍNDICE DE ANEXOS	xiii
ABREVIATURAS	xiv
RESUMEN	xv

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN	16
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	
1.1 El género <i>Manihot</i>	20
1.2 <i>Manihot esculenta</i> Crantz	20
1.2.1 Posición taxonómica	20
1.2.2 Descripción morfológica	21
1.2.3 Propagación	21
1.2.4 Composición tóxica	21
1.2.5 Forma de consumo	21
1.2.6 Genética	22
1.2.7 Distribución	22
1.2.8 Diversidad	25
1.3 Marcadores moleculares	27
1.3.1 Marcadores bioquímicos	27
Proteínas de reserva de semillas	27
Isoenzimas	28
1.3.2 Marcadores genéticos	28
Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	28
Fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar (RAP)	29
Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	30
Secuencias sencillas repetidas (SSR)	31
Ventajas	31
Limitaciones	32
Origen	32

1.4 Análisis estadístico de diversidad genética	34
1.4.1 Riqueza de alelos	34
1.4.2 Frecuencia alélica	34
1.4.3 Contenido de índice polimórfico	34
1.4.4 Heterocigosidad	35
1.4.5 Diferenciación genética	35
1.4.6 Distancia genética	36
Índice de similitud	36
Coeficiente de DICE	37
Árboles de distancia genética	38
UPGMA	38
1.4.7 Coeficiente de correlación cofenética (r)	39
1.4.8 Bootstrapping	39
1.4.9 Distribución geográfica	39

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material biológico	41
2.1.1 Siembra de accesiones de yuca	44
2.2 Identificación de marcadores SSR	45
2.2.1 Selección de iniciadores	45
2.2.2 Extracción de ADN	45
2.2.3 cuantificación de ADN	46
2.2.4 Amplificación de las secuencias microsatélites	50
Preparación del ADN molde	50
Protocolos de amplificación	50
Programa de amplificación	51
2.2.5 Electroforesis de los productos de amplificación	53
Preparación del gel de poliacrilamida	53
Instalación y pre-electroforesis del gel	53
Marcador de peso molecular	53
Denaturación	54
Cargado y corrida electroforética de las muestras	54

2.2.6 Tinción con nitrato de plata	54
Fijación	54
Lavado del gel	55
Impregnación de la plata	55
Lavado post-impregnación	55
Revelado	55
2.2.7 Determinación del tamaño de alelos	57
2.2.8 Registro de marcadores	58
2.3 Análisis de diversidad genética	59
2.3.1 Contenido de índice polimórfico (PIC)	59
2.3.2 Riqueza de alelos	59
2.3.3 Distancia genética	59
2.3.4 Patrones genéticos	61
2.4 Análisis de distribución espacial	63
2.4.1 Distribución espacial de accesiones con características de interés	63
2.4.2 Distribución espacial de la diversidad genética	64

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Diversidad genética	65
3.1.1 Contenido de índice polimórfico (PIC)	65
3.1.2 Riqueza de alelos	65
3.1.3 Análisis de distancia genética	71
3.1.4 Patrones genéticos	77
3.2 Distribución espacial	82

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN	92
CONCLUSIONES	96
RECOMENDACIONES	97
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Distribución geográfica del género <i>Manihot</i> en América y centros de diversidad según Nassar (2001).	24
Figura 2. : Ejemplo de diversidad de tallos (a) y hojas (b) de <i>Manihot esculenta</i> “yuca” colectados en Ucayali-Perú.	26
Figura 3. Polimorfismo y carácter codominante de los marcadores (SSR).	33
Figura 4. Distribución de los sectores de colecta de <i>Manihot esculenta</i> Crantz en Ucayali.	42
Figura 5. Área de colecta en las cuencas: Aguaytía, Ucayali y San Alejandro; y Carretera San Alejandro.	43
Figura 6. Accesiones de yuca sembradas en el invernadero (a) y partes de la planta usada para la extracción de ADN (b).	44
Figura 7. Resumen del proceso para la cuantificación del ADN extraído. Paso 1: Preparación del gel de agarosa, Paso 2: Cargado del gel, Paso 3: Electroforesis, Paso 4: Fotografiado del gel y Paso 5: Cuantificación del ADN.	48
Figura 8. Calidad y cantidad de DNA extraído (a) y muestras de ADN con concentraciones uniformizadas para el análisis molecular (b).	49
Figura 9. Pasos básicos de la reacción en cadena de la polimerasa-PCR. Paso 1: denaturación, paso 2: annealing y paso 3: extensión.	52
Figura 10. Resumen del proceso para visualizar regiones microsatélites. Paso 1 Amplificación de marcadores microsatélites por PCR, paso 2: Cargado en gel de poliacrilamida para la electroforesis vertical, paso 3: Tinción con nitrato de plata, paso 4: Registro de presencia “1” o ausencia “0” de alelos.	56
Figura 11. Plásmido de secuenciamiento (pUC18 cortado con la enzima PSTI) usado para determinar el tamaño de los alelos.	57

Figura 12. Registro de datos (a) y matriz de datos en hoja Excel (b)	58
Figura 13. Dendograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud DICE; y los valores de porcentaje Bootstrap, indicando el grado de confiabilidad de los grupos.	72
Figura 14: Accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106.	75
Figura 15. Grupo y subgrupo a los que pertenecen las accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106 y valores de porcentaje Bootstrap.	76
Figura 16. Distribución geográfica de los alelos con baja frecuencia por locus.	83
Figura 17. Distribución geográfica de los posibles duplicados, según el análisis de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud DICE de datos de marcadores moleculares microsatélites.	84
Figura 18. Distribución geográfica de los grupos unitarios, según el análisis de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud DICE de datos de datos de marcadores moleculares microsatélites.	85
Figura 19. Distribución geográfica de las accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106.	86
Figura 20. Distribución geográfica de las áreas con mayor riqueza de grupos formados en el análisis de agrupamiento.	88
Figura 21. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética, según el análisis de datos moleculares microsatélites con el programa DIVA-GIS.	89
Figura 22. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética en las cuencas del Aguaytía y Ucayali, según el análisis de datos moleculares microsatélites con el programa DIVA-GIS.	90
Figura 23. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética en la cuenca San Alejandro y márgenes de la carretera San Alejandro, según el análisis de datos moleculares microsatélites con el programa DIVA-GIS.	91

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Número de accesiones colectadas y analizadas por sector, cuenca, carretera, y grupo sociocultural.	41
Tabla 2. Iniciadores seleccionados para la amplificación de marcadores SSR de 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> .	47
Tabla 3. Protocolo de amplificación para una muestra de ADN de <i>Manihot esculenta</i> , estandarizado para condiciones del Laboratorio de Biología molecular de la SUDIRGEB-INIEA.	50
Tabla 4. 23 loci SSR con sus respectivos rangos de peso de alelos, número de alelos identificados y contenido de índice polimórfico en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , colectadas en Ucayali-Perú.	66
Tabla 5. Alelos en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , colectadas en 8 sectores de la región Ucayali-Perú.	67
Tabla 6. Alelos en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , colectadas en 3 cuencas y márgenes de una carretera de la región Ucayali-Perú.	68
Tabla 7. Alelos en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , según grupo sociocultural: comunidades de y de Colonos, de la región Ucayali-Perú.	69
Tabla 8. Alelos de baja frecuencia por locus, en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> colectadas en la región Ucayali-Perú.	70
Tabla 9. Cuadro resumen de número de grupos por sector, cuenca, carretera y grupo sociocultural.	73
Tabla 10. Posibles duplicados según análisis de agrupamiento UPGMA, de 23 locus SSR, en 100 accesiones colectadas en Pucallpa de la región Ucayali-Perú.	74

Tabla 11. Parámetros genéticos de diversidad, en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> colectadas en ocho sectores de la región Ucayali-Perú.	77
Tabla 12. Índices de fijación, en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> colectadas en ocho sectores de la región Ucayali-Perú.	78
Tabla 13. Valores de heterocigosidad esperada en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> colectadas en 3 cuencas y márgenes de 1 carretera de la región Ucayali-Perú.	78
Tabla 14. Parámetros genéticos de diversidad de 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , colectadas en tres cuencas y márgenes de una carretera, de la región Ucayali-Perú.	79
Tabla 15. Valores de heterocigosidad observada e índice de fijación intrapoblacional en 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> , colectadas en tres cuencas y márgenes de una carretera de la región Ucayali-Perú.	79
Tabla 16. Parámetros genéticos de diversidad de <i>Manihot esculenta</i> en las cuencas del Aguaytía y Ucayali de la región Ucayali.	80
Tabla 17. Parámetros genéticos de diversidad de de <i>Manihot esculenta</i> la cuenca San Alejandro y márgenes de la carretera San Alejandro de la región Ucayali.	80
Tabla 18. Valores de heterocigosidad esperada y observada e índice de fijación intrapoblacional en 100 accesiones <i>Manihot esculenta</i> colectadas en comunidades de nativos (CCNN) y de colonos (CCCC) de la región Ucayali.	81
Tabla 19. Parámetros genéticos de diversidad de 100 accesiones de <i>Manihot esculenta</i> colectadas en comunidades de nativos (CCNN) y de colonos (CCCC) de la región Ucayali	81

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO I. Datos de pasaporte de las accesiones analizadas	103
ANEXO II. Prueba de significancia estadística: Mann-Whitney	108
ANEXO III. Soluciones para la extracción de ADN	116
Tampón de extracción CTAB 2X	116
Tampón de extracción CTAB 10X	116
Tampón T ₁₀ E ₁	116
ARNasa 10mg/mL	116
ANEXO IV. Electroforesis en geles de agarosa	117
Preparación de geles de agarosa al 1%	117
Tampón de carga para geles de agarosa (SALB 10X)	117
ANEXO V. Soluciones para electroforesis de poliacrilamida	118
Solución stock de acrilamida 40%	118
Solución de acrilamida 6%, urea 7M	118
Solución de nitrato de plata	118
Solución de Carbonato de Sodio	118
Tampón de carga para geles de poliacrilamida	119
Dye	119
Peso molecular de los colorantes en geles de poliacrilamida	119
ANEXO VI. Tampón TBE	119
ANEXO VII. Marcadores de peso molecular	120
Reacción de secuenciamiento	120
Preparación de placa de la reacción de secuenciamiento	120
Programa PCR de secuenciamiento del plásmido pUC 18	120
DNA sequencing system pUC 18	121
ANEXO VIII. Tamaño en pares de bases de los alelos identificados por cada iniciador en 100 entradas de <i>Manihot esculenta</i>, según el sistema de secuenciamiento de ADN del plásmido pUC18.	122
ANEXO IX. Número de alelos identificados de <i>Manihot esculenta</i> en trabajos de diferentes países con marcadores SSR (www.ciat.cgiar.org/molcas, 2002).	123

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados)
CIAT	Centro internacional de Agricultura Tropical
CIP	Centro Internacional de la Papa
CTAB	Bromuro de cetil-trimetil-amonio
dNTP	Desoxiribonucleotido
EDTA	Etilen diamine tetra-acetic acid (ácido etilen-diamino-tetra acético)
µg	microgramo
µL	microlitro
µM	micromolar
mM	milimolar
ng	nanogramo
NTSYS	Numerical taxonomic system (sistema de taxonomía numérica)
pb	pares de bases
PCR	polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)
PVP	Poli vinil pirrolidona
RAPD	Random amplified polymorphism DNA (polimorfismo en el ADN amplificado aleatoriamente)
RFLP	Restriction fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción)
SSR	Simple sequence repeats (secuencias simples repetidas)
STR	Short tandem repeat (repetición corta en tándem)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-metil etilen di-amina
UPGMA	Unweighted pair-group method using arithmetic averages (método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas)

RESUMEN

Ante el grave problema de pérdida progresiva de la diversidad genética muchas entidades hacen esfuerzos por evitar dicho proceso, conservando en bancos de germoplasma especies con valor cultural, social y nutricional, como es el caso de *Manihot esculenta* Crantz comúnmente llamada yuca.

En el Perú se cuenta con germoplasma de yuca conservado en el Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria (INIEA), del cual se tomó 100 accesiones colectadas de ocho sectores de la región Ucayali, distribuidos en tres cuencas (Aguaytía, Ucayali y San Alejandro) y márgenes de una carretera (San Alejandro). Además, estas accesiones provienen de dos grupos socioculturales (nativos y colonos).

El análisis de diversidad genética y distribución espacial, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB) del INIEA en el periodo del 2003 a 2005, mediante marcadores moleculares SSR, para lo cual se seleccionaron 25 iniciadores.

Los resultados muestran que la yuca tiene alta diversidad genética en el área de colecta ($H_t = 0.67$). Mediante el análisis de agrupamiento se formaron 22 grupos, conformados por accesiones no relacionadas por origen geográfico. También se halló que entre la cuenca del Aguaytía y Ucayali, la primera es más diversa genéticamente ($H_{ei} = 0.67$) y que es probable un intercambio de germoplasma limitado entre estas ($F_{st} = 0.34$). En la cuenca y carretera San Alejandro se conserva alta diversidad ($H_{ei} = 0.66$), pero no diferente genéticamente una de la otra ($F_{st} = 0.004$). Los dos grupos socioculturales conservan alta diversidad, presentándose el mayor valor en comunidades de colonos ($H_{ei} = 0.68$), mas el análisis de diferenciación genética indica haber un intercambio de germoplasma ($F_{st} = 0.004$). Además se identificó 10 posibles duplicados con una distribución geográfica que fortalece los valores de diversidad y diferenciación genética hallados, así también 6 accesiones genéticamente distantes de las demás y un subgrupo cuya característica es la presencia de tres alelos para el locus SSRY106.

El análisis de distribución geográfica de la diversidad genética, con el Programa DIVA-GIS usando los datos moleculares, confirmó los resultados obtenidos del análisis de riqueza alélica, agrupamiento (similitud genética) y diferenciación genética (F).

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

Conforme la humanidad crece se van perdiendo ecosistemas que sustentan la vida y ofrecen a la sociedad una variedad indispensable de beneficios. Uno de estos es la biodiversidad, es decir el conjunto de genes, poblaciones, especies y comunidades; los cuales son elementos funcionales de los ecosistemas del planeta.

Hernández y et al. (2001) indican que se está perdiendo una parte considerable de la diversidad de especies, y quizá resulte imposible detener esto antes de que llegue la mitad del siglo XXI. El problema más grave de aquel proceso es que, una vez perdida una especie es irrecuperable, en otras palabras, es para siempre.

La diversidad es el elemento que promete mayor potencial de oportunidades de desarrollo. En el Convenio sobre Diversidad Biológica, firmado por sesenta y ocho países en 1993, se manifiesta que los recursos biológicos de la tierra son fundamentales para el desarrollo económico y se estima que estos satisfacen el 80% de las necesidades de las poblaciones más pobres (Tapia, 1996). Además, hoy en día se reconoce que la supervivencia de la humanidad depende de la variedad de plantas y la pérdida de esta, constituye uno de los mayores peligros para la provisión de alimentos (Tapia, 1996).

Ante la pérdida de diversidad biológica, muchas entidades iniciaron la colecta y conservación de germoplasma vegetal, asimismo establecieron sistemas de bancos de germoplasma nacionales e internacionales. Estas actividades dirigidas a evitar la pérdida de la diversidad no quedan ahí, sino llevan al reto de establecer estrategias de conservación y de estudios a profundidad de los elementos de la biodiversidad conservados; para conocer sobre bases sustentables su composición, relaciones geográficas y evolutivas y potencial como recurso primario para el desarrollo humano.

En las Colecciones de germoplasma hallamos, además de sus componentes, la información esencial para generar el conocimiento de la diversidad biológica y su distribución geográfica. Los especímenes recolectados y depositados en las colecciones son registrados junto a la información asociada a estos (localidad de colecta, fecha, hábitat) que contienen los datos básicos para conocer la diversidad biológica en una región determinada. Las colecciones de germoplasma constituyen herramientas

fundamentales en los estudios de diversidad biológica; son fuentes de alelos para el mejoramiento de cultivos, por lo tanto, la extensión de diversidad fenotípica y genética, presente dentro de estos bancos, debería ser determinada completamente (Hernández y et al., 2001). Esto permitirá una organización apropiada de germoplasma y además el desarrollo de parentales mejorados y nuevos cultivos.

Los estudios diversidad genética en plantas han estado relacionados a los caracteres agronómicos y comerciales. La caracterización del germoplasma se ha basado fundamentalmente en características de alta y baja heredabilidad, medidas a través del fenotipo. Sin embargo, las principales limitantes de esta caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de genes involucrados.

El estudio con marcadores moleculares ha permitido dar un gran paso en el estudio de la diversidad genética. Actualmente, con los avances de las técnicas moleculares podemos observar diferencias a nivel del ADN entre plantas que serían idénticas en base a observaciones de caracteres fenotípicos (Cenis, 2000). Por tanto, permiten conocer la diversidad en una colección de germoplasma.

Los microsatélites brindan la más elevada información de polimorfismo en términos de marcadores moleculares (Ferreira, 1998), lo cual los hace los indicados para estudios de diversidad genética. Aquellos, se muestran como secuencias cortas de nucleótidos (motivos) en el genoma, cuyo número de repeticiones varía de un individuo a otro lo que hace posible identificar genotipos diferentes (Cenis, 2000).

La información molecular amplía el conocimiento de la diversidad genética del germoplasma conservado y con la información referida a su origen geográfico de colecta, se facilita el uso de este material genético. Además, el sistema de información referenciada geográficamente (GIS) hace posible combinar ambos tipos de información (molecular y geográfico) y posee funciones que permiten observar la diversidad genética de las zonas de colecta, seleccionar posibles sitios para colectas o desarrollar estrategias de conservación (IPGRI, 2001); por tanto, este sistema sugiere una expectativa interesante en su aplicación a la conservación de la diversidad biológica.

Debido a la importancia del estudio de los componentes de una colección de germoplasma y al valor de la yuca como cultivo nativo de Sur América, fuente importante

de carbohidratos (el cuarto lugar en el los trópicos y el sexto a nivel mundial) y conociendo antecedentes de una alta diversidad genética en el Perú, se realizó el estudio de diversidad genética con marcadores moleculares microsátélites en 100 accesiones de *Manihot esculenta* “yuca” (actualmente mantenidas en el la Estación Experimental Donoso del INIEA) colectadas en la región Ucayali por el proyecto “Modelos de diversidad y erosión genética de los cultivos tradicionales de Perú y accesoria rápida utilizando las herramientas del GIS”.

Objetivo general

- 1 Analizar la diversidad genética existente en el germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz (yuca) de Ucayali - Perú, mediante marcadores SSR; y determinar su distribución espacial usando el programa DIVA-GIS.

Objetivos específicos

- Determinar el poder discriminativo de los iniciadores, mediante el cálculo del contenido de índice polimórfico.
- Analizar la riqueza de alelos en el germoplasma de *Manihot esculenta* "yuca" por sector de colecta, cuenca o márgenes de carretera y grupo sociocultural, mediante la determinación de número de alelos.
- Analizar la distancia genética en el germoplasma de *Manihot esculenta* "yuca" por sector de colecta, cuenca o márgenes de carretera y grupo sociocultural, mediante análisis de agrupamiento.
- Analizar patrones genéticos en el germoplasma de *Manihot esculenta* "yuca" por sector de colecta, cuenca o márgenes de carretera y grupo sociocultural, mediante el cálculo de heterocigosidad y diferenciación genética.
- Determinar la distribución espacial de accesiones con características de interés para el estudio de diversidad en el germoplasma de *Manihot esculenta* "yuca" colectado en la región Ucayali, utilizando el software DIVA-GIS.
- Determinar la distribución espacial de la diversidad genética en base riqueza de grupos y disimilitud genética de *Manihot esculenta* "yuca" en los sectores de colecta, cuencas y márgenes de carretera, utilizando el software DIVA-GIS.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

1.1 El género *Manihot*

Las especies de *Manihot* varían de sub-arbustos, arbustos a árboles. La mayoría produce látex y contiene glucósido cianogénico. Las raíces de las especies silvestres, en contraste con los cultivados son fibrosos y delgados, pero algunas especies frecuentemente exhiben un número limitado de raíces tuberosas (Nassar, 2001).

El género *Manihot* tiene su origen en América Latina, Nassar (2001) identificó cuatro regiones de concentración de diversidad de *Manihot*: Centro de Brasil, con 38 especies silvestres; Suroeste de México, con 16 especies silvestres; noreste de Brasil, con 16 especies silvestres y Sur oeste de Mato Grosso y Bolivia con 6 especies silvestres. Según Rogers y Apan (1973), citado por Nassar (2001), este género incluye 98 especies y Alves (2002) indica que se reportó cerca de 100 especies; de los cuales sólo es cultivado comercialmente una: *Manihot esculenta* Crantz y esta no ha sido vista en estado silvestre (Nassar, 2001).

1.2 *Manihot esculenta* Crantz

1.2.1. Posición Taxonómica

La yuca; según Takhtajan en 1981, (Flores y Vilcapoma, 2003) se encuentra en la siguiente posición taxonómica:

Reino:	Plantae
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Dilleniidae
Orden:	Euphorbiales
Familia:	Euphorbiaceae
Género:	<i>Manihot</i>
Especie:	<i>Manihot esculenta</i> Crantz

1.2.2 Descripción morfológica

Es un pequeño arbusto o pequeño árbol de 1,3 a 5 m de altura (Duke, 1983) comúnmente conocido como tapioca, manioc, mandioca y yuca en diferentes partes del mundo (Alves, 2002). El hábito de crecimiento puede ser erecto o ramificado. Presentan tallos que fluctúan desde marrón claro a amarillo. Las raíces carnosas, tuberosas y elongadas, llegan a medir hasta 2,5 m de longitud y 10 a 15 cm de diámetro con un peso promedio de 4 a 7 kg (Duke, 1983). Las hojas son dactiliformes con 3 a 7 lóbulos de 7,5 a 15 cm de longitud de forma espatulada a linear lanceolada. Las plantas pueden ser monoicas y ocasionalmente dioicas; las flores están dispuestas en panícula; los frutos son esquizocarpo capsular, de aproximadamente 1,5 cm de ancho con tres semillas cada uno (Duke, 1983 y Alves 2002).

1.2.3 Propagación

Este cultivo es de propagación vegetativa, se multiplica por estacas. Estas, según Casseres (1986), se obtienen de la parte intermedia de tallos de plantas adultas, eliminando la parte superior tierna y sección basal; deben medir 0.30 a 0.50 cm y llevar cuatro a seis yemas cada una.

1.2.4 Composición tóxica

La yuca contiene glucósidos cianogénicos causantes de algunos problemas en el marketing de esta. Se encuentran en toda la planta; las hojas tienen las concentraciones más altas; mientras que en las raíces la cáscara es la que presenta una concentración mayor. Ellos, se convierten en HCN (ácido hidrocianogénico) en presencia de linamarasa, una enzima natural de la yuca, que actúa sobre los glucósidos cuando las células se desgarran (O'Hair, 1995 y Alves, 2002).

1.2.5 Forma de consumo

Las raíces son usualmente peladas y hervidas, asadas, o fritas. En escenas tradicionales de América las raíces de yuca machacadas y exprimidas son secadas a fuego alto y se usa para hacer comidas o son fermentadas. Ciertos

habitantes utilizan redes en las que Colocan la raíz de yuca molida y la lavan y estrujan hasta que eliminan la sustancia tóxica (O'Hair, 1995 y FAO–FRG, 2002). En medicina folklórica es usado para curar la tos, abscesos, forúnculos, conjuntivitis, diarrea, disentería, gripe, hernia, inflamaciones, marasmos, prostatitis, llagas, espasmos, hinchazones y tumores (Duke, 1983)

El proceso comercial de la yuca es limitado. Es vendida en los Estados Unidos como raíces peladas envasadas y congeladas y fritas, similar a los chips de papa, (O'Hair, 1995). Otros productos industrializados son las hojuelas de yuca, los almidones de uso en textil, manufactura de papeles y la yuca pelada la que es base del postre de tapioca (Casseres, 1986).

1.2.6 Genética

La genética de la yuca es la menos conocida de cualquiera de los cultivos principales (arroz, maíz y papa) que alimenta a la humanidad (Fregene y et al., 1997). La yuca es considerada aloploide, pero no es conocido del ancestro diploide. De Carvalho y Guerra (2002) menciona que Jennings en 1963 sugirió que el género *Manihot* podría ser un alotetraploide derivado del número básico de la familia, $x = 9$, así también reportan que todas las accesiones de *Manihot*, estudiados por ellos, presentan un cariotipo similar. Además, este cultivo, es altamente heterocigota y uniformemente: $2n = 4x = 36$ (O'Hair, 1995 y De Carvalho y Guerra ,2002). Fregene y et al. (1997) indica que Awoleye (1994) da medidas de flujo citométrico del ADN nuclear, revelando un contenido de DNA diploide de 1.67 pg por célula, y que Bennet y et al. (1992) revelan que este valor corresponde a 772 pares de megabases en el genoma haploide y es por el tamaño esta ubicado en el extremo inferior del rango para las plantas superiores.

1.2.7 Distribución

La yuca es nativa de Sur América (Figura 1) donde es extensamente cultivada. Fue establecido hace más o menos 10 000 años y hasta hoy, continúa siendo ampliamente cultivado de Meso-América a Argentina, con Brasil, Colombia y Paraguay como principales productores (Rogers 1963; Pearsall, 1992; Saber, 1993; citados por Fregene y et al., 2003). En Perú es cultivada en la costa central en setiembre a octubre y en costa norte y selva todo el año (Tapia y Torres, 2002).

También es cultivada en los trópicos y a veces en los subtrópicos del viejo mundo. En África, Nigeria tiene el área más grande de siembra de variedades mejoradas; a este continente fue introducida por los barcos de esclavos portugueses de Brasil, durante los años 1500 hasta 1800, y a Asia en el siglo XVIII. Además, en el siglo XIX fue finalmente establecida en el sur y sureste de Asia (Fregene y et al., 2003).

Algunos países, donde también es cultivada, vienen desarrollando programas extensivos a futuro de mejoramiento de este cultivo, por ejemplo: México, América Central, Brasil, Colombia, Jamaica, África, China, Madagascar, Indonesia, Estados Federados de Malaya, Tailandia, India, Islas de Filipinas, Paraguay, Fiji y Sri Panka (Duke, 1983).

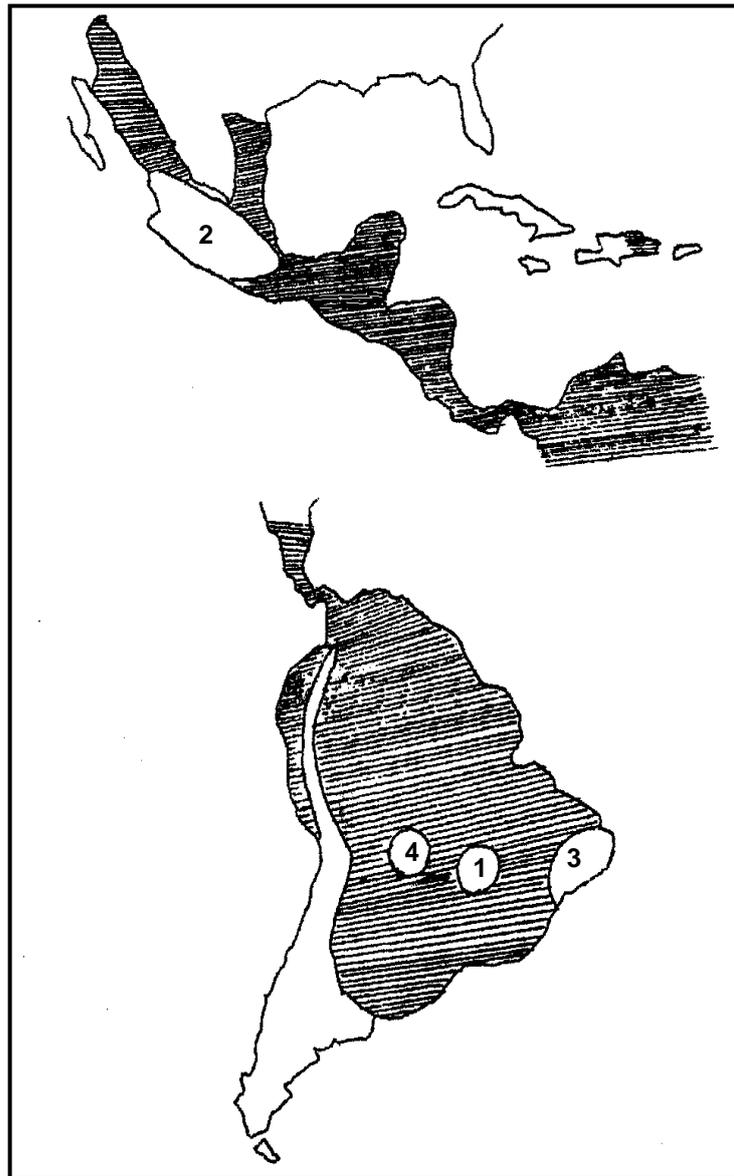


Figura 1. Distribución geográfica del género *Manihot* en América y centros de diversidad según Nassar (2001): centro 1= Brasil (38 especies silvestres), centro 2 = México (16 especies silvestres), centro 3 = Brasil (18 especies silvestres), centro 4 = Brasil (6 especies silvestres).

1.2.8 Diversidad

En general las yucas son separadas en dos grandes grupos de acuerdo a su contenido en derivados cianhídricos; así tenemos las variedades dulces que contienen menos del 0.1% de ácido prúsico y pueden ser usados en crudo para alimentación de ganado y las variedades amargas contienen de 0.02 a 0.03 % de ácido prúsico y deben ser elaborados antes de ser usados (FAO–FRG, 2002).

La clasificación de las yucas se apoyan en criterios morfológicos, como por ejemplo de diversidad de Colores y formas de tallos u hojas como se muestra en la figura 2, y en algunos casos es según lazos sociales (por analogía morfológica y propiedades), sin tomar en cuenta varios caracteres que sirven para identificar y nombrar una variedad. Sin embargo, esos criterios dan origen a gran número de variedades locales que nos da idea de diversidad genética de *Manihot esculenta*.

La diversidad de variedades, según clasificación local, es grande. Empeaire, Pinton y Second (2001) mencionan que han encontrado 137 variedades en Alto Río Negro (Brasil), que Kerr (1986) censó 40 variedades y Boster (1984) una centena en Perú. En las memorias del seminario-taller: “Parientes Silvestres de los cultivos Nativos en el Perú” se describe 26 según nomenclatura vernacular (Tapia y Torres, 2002), pero Brack (2003) indica que en la amazonía peruana existen 50 y los aguarunas del Alto marañón conocen entre 100 y 200.

Se emplearon diferentes marcadores moleculares en estudios de diversidad genética de yuca, entre ellos podemos mencionar las isoenzimas (Lefèvre y Charrier, 1993; Fernández. y et al., 2000 y Resende y et al., 2004); RFLP (Breching y et al., 1993), RAPD (Marmey y et al., 1994), AFLP (Chavarriaga y et al., 1999), pero los SSR fueron los más recomendados para estudios de diversidad por su alto polimorfismo pudiéndose hallar valores de heterocigosidad media de 0.53 en muestras de germoplasma de 9 países (Fregene y et al., 2003), al igual que en 20 muestras de yuca de la *World Core Collection* mantenida en el Centro Internacional de Agricultura Tropical en Cali-Colombia (Olsen y Shaal, 2001) y 0,58 en 258 accesiones de Nigeria y Guatemala (Dixon y et al., 2000); mientras que las isoenzimas hallaron un valor de 0,35 en 141 variedades de yuca de Brasil (Fernández y et al., 2000) y 0,23 en 365 accesiones colectadas en África (Lefèvre y Charrier, 1993).



Figura 2: Ejemplo de diversidad de tallos (a) y hojas (b) de *Manihot esculenta* "yuca" colectados en Ucayali-Perú.

1.3. Marcadores moleculares

Un marcador molecular es un fenotipo molecular producto de la expresión de un gen, como las alozimas o los segmentos específicos de ADN en una corrida electroforética (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Pueden Ser divididos en dos grupos: marcadores bioquímicos y marcadores genéticos.

1.3.1 Marcadores bioquímicos

Proteínas de reserva en semillas

Existen diversos métodos analíticos para el estudio de proteínas de reserva tales como centrifugación, cromatografía, análisis de amino ácidos y electroforesis (Becerra y Paredes, 2000). El estudio de proteínas de almacenamiento en diversidad genética se basa en el hecho de que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirían bandas similares o diferentes. Debido a que las proteínas carecen de actividad enzimática ellas son detectadas por técnicas en gel, por medio de técnicas generales de teñido (Becerra y Paredes, 2000).

Las proteínas de reserva como marcador bioquímico tienen una baja influencia ambiental, además permite un análisis rápido de decenas de muestras por ser simple y de bajo costo comparado con otras técnicas (Becerra y Paredes, 2000). Sin embargo, los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que pueden incluir sustituciones, inserciones y pérdidas nucleotídicas (Becerra y Paredes, 2000). También las diferencias pueden ser a causa de modificaciones pre y post transcripción y/o traducción. Hasta ahora ha sido difícil relacionar los cambios fenotípicos de los patrones de bandas con el tipo de cambio a nivel molecular (Becerra y Paredes, 2000). Por otro lado, la cantidad de diversidad genética mediante polimorfismo proteico puede ser subestimada por la no detección de mutaciones silenciosas (Becerra y Paredes, 2000).

Isoenzimas

Las isoenzimas son formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. La base para utilizar datos isoenzimáticos, es que las diferencias de movilidad electroforética de las isoenzimas son resultantes de las diferencias a nivel de secuencias de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón, PAGE) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un teñido histoquímico. La separación se hace mediante procedimientos electroforéticos, ya que la migración es según la carga y peso molecular (Nuez y Carrillo, 2000).

Sus desventajas incluyen el bajo nivel de polimorfismo, presentan diferencias de actividad asociadas a diferentes fases de desarrollo de los organismos, pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, y sólo un grupo de genes estructurales están representados, es decir sólo una parte del genoma puede ser evaluado. Otro aspecto a considerarse es que pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.3.2 Marcadores genéticos

Cuando el marcador molecular tiene comportamiento ajustado a las leyes básicas de la herencia mendeliana, es definido como marcador genético (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Las técnicas empleadas en la obtención de estos marcadores moleculares han facilitado los estudios de diversidad genética, ya que permiten la obtención de un número prácticamente ilimitado de estos y el muestreo de todo el genoma del organismo.

Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Esta técnica se define como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de ADN. Este polimorfismo

es generado por la presencia o ausencia de los sitios de restricción en el genoma, así como las diferencias en las secuencia del ADN entre los sitios de restricción (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por medio de una autoradiografía de rayos X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Los marcadores RFLP son codominantes, permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no codificadoras del ADN (exones e intrones). Sus principales ventajas son la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectados por el medio ambiente, no presentan efectos pleiotrópicos, y pueden ser evaluados en cualquier etapa de desarrollo del organismo.

Dentro de sus principales desventajas se incluyen el uso de radioactividad y las tareas laboriosas, lentas y caras que deben ser llevadas a cabo como es la clonación de las sondas y detección de RFLP en las membranas (Ferreira y Grattapaglia, 1998)

Fragmentos Polimórficos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)

Consiste en una PCR usando iniciadores aleatorios de 10 pb para amplificar el ADN. Los productos de amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular, representan diferentes loci (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los resultados de RAPD, obtenidos en plantas, indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5 a 10 loci por iniciador), su potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudio de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Las principales ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo como desventaja aparece la inconsistencia de los datos debido a que pueden dar origen a resultados diferentes por falta de uniformidad de las condiciones de laboratorios con pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP)

En esta técnica se combinan los principios de los RFLP y PCR, y se obtiene un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El procedimiento implica la digestión del ADN genómico con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente y la otra de corte frecuente, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño. Luego se ligan adaptadores de secuencia conocida a cada extremo y se realiza una amplificación preselectiva con iniciadores que además de la secuencia complementaria al adaptador poseen una base adicional, seguidamente se lleva a cabo la amplificación selectiva con otros iniciadores que poseen dos nucleótidos extras a los anteriores iniciadores de amplificación. Finalmente, hay dos alternativas de detección de bandas, la primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado de gel y su visualización en autoradiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Estos marcadores son de carácter dominante, al igual que los RAPD (los genomas heterocigotos no pueden discriminarse directamente de los homocigotos), además, la técnica presenta homoplasia. Por otro lado, la digestión parcial o la mala calidad del ADN pueden generar presencias o ausencias de bandas en posiciones no correspondientes que llevaría a interpretaciones erróneas del polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Secuencias sencillas repetidas (SSR)

Los SSR o microsatélites consisten en pequeñas secuencias (motivos) de 1 a 6 pb adyacentes repetidos lado a lado (Murray, 1996). En las plantas están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases, siendo el elemento repetido más común el dinucleótido AT (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Las regiones microsatélites son amplificadas a través de PCR a partir de un par de iniciadores específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a las secuencias únicas que flanquean el microsatélite. Luego estos productos pueden ser visualizados por revelados con nitrato de plata o mediante métodos radioactivos o de fluorescencia. Cada microsatélite, independientemente del elemento repetido, constituye un locus genético altamente variable, multialélico, de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente representa un alelo diferente del mismo locus, como se muestra en la figura 3. Los SSR, poseen expresión codominante, es decir, ambos alelos de un individuo heterocigoto son visualizados (Figura 3) y son altamente multialélicos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Ventajas

Son los que poseen el más elevado contenido de información de polimorfismo o PIC (contenido de información polimórfico) en términos de marcadores moleculares (Ferreira y Grattapaglia, 1998). El polimorfismo resulta de la presencia de diferentes números de elementos simples repetidos resultando en una variabilidad en sus loci y por lo tanto, estos marcadores son los más adecuados para estudios de diversidad.

Aunque estas regiones son muy variables (hipervariables), sus regiones flanqueantes son altamente conservadas lo que permite diseñar iniciadores que muestren con gran especificidad estos loci (Andrade, 2001).

Son muy frecuentes y están distribuidos relativamente espaciados con uniformidad al azar (Murray, 1996), permitiendo la más completa cobertura de cualquier genoma eucariota.

La mayoría de los loci son selectivamente neutros lo cual los hace compatibles con los postulados en la mayoría de las teorías de genética de poblaciones (Murray, 1996)

Técnicamente son preferidos, debido a que se analizan vía PCR, los alelos pueden ser medidos en geles de poliacrilamida, el análisis de pequeños fragmentos permite el análisis de muestras degradadas en el cual el tamaño de fragmento principal del ADN genómico ha sido severamente reducido por condiciones ambientales (Murray, 1996).

Limitaciones

Una de las limitaciones es la cantidad de trabajo previo necesario para el desarrollo de estudios con estos marcadores, que requiere de personal especializado y equipamiento sofisticado difícil de conseguir: una biblioteca de fragmentos genómicos pequeños (300 a 500 pb) para el organismo de interés; la selección de microsatélites con sondas sintéticas complementarias a los elementos repetidos más comunes, por ejemplo poli-AT en plantas; el secuenciamiento de los clones positivos y la construcción de pares de iniciadores específicos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Para varias especies de plantas, en especial de hábito alógamo, el elevado nivel de de diversidad genética, detectables con técnicas más accesibles, no justifica la magnitud de la inversión necesaria para el desarrollo de marcadores SSR (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Origen

La mayoría de los cambios en número de copias en los microsatélites son causados por errores durante la replicación del ADN: “slip-strand misparing” (SSM), esto ocurre cuando la cadena, que se esta sintetizando, se repliega sobre si misma formando un lazo, entonces la polimerasa sintetizará incrementando el número de repeticiones. En cambio, cuando la cadena molde es la que se repliega, se producirá una disminución. Otro modelo propuesto es el causado por un elevado promedio de “crossing-over” desigual (UCO) en los microsatélites (Goldstein y Schiotter, 1999).

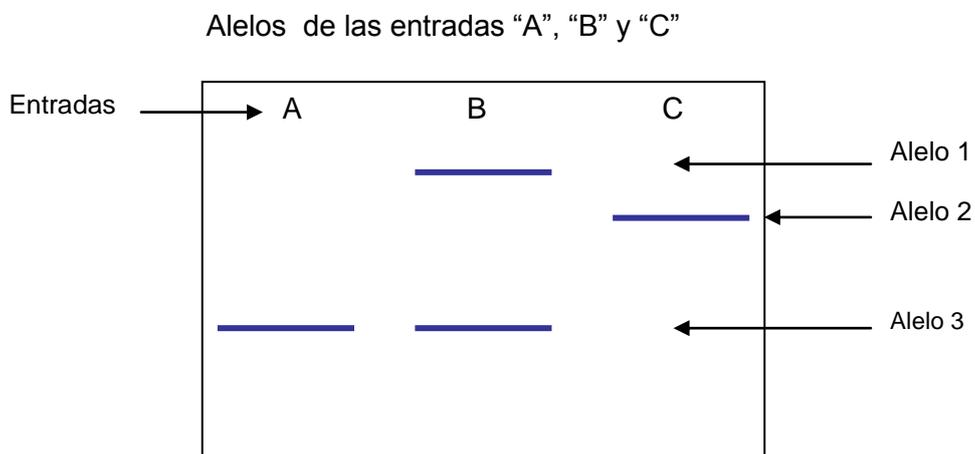
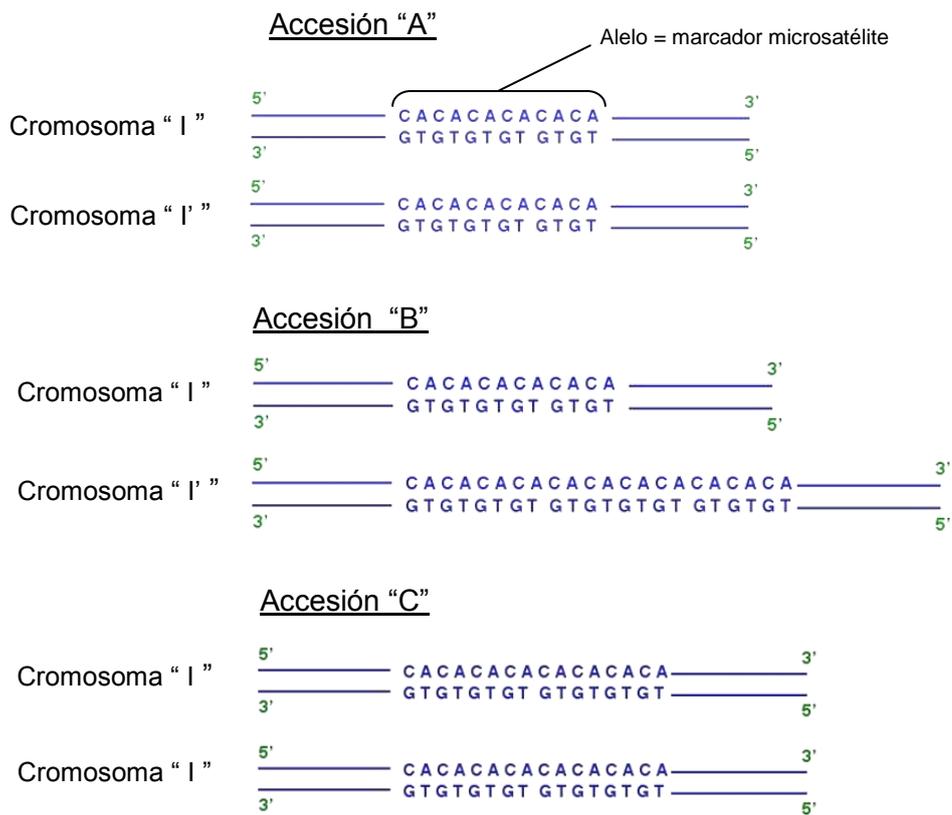


Figura 3. Polimorfismo y carácter codominante de los marcadores microsatélites.

1.4. Análisis estadístico de diversidad genética

Diversidad genética se define como la cantidad de variación genética presente en una población o especies como consecuencia de su vía evolutiva, Mayrard en 1996 (FAO, 2003) da una definición cuantitativa de diversidad genética como el número de alelos diferentes por loci y la proporción de loci con más de un alelo en una especie o población.

Dada las definiciones, la diversidad genética puede ser medida dentro y entre poblaciones tanto de una especie y de especies. Si nos referimos a la variación dentro de una especie podemos hablar de la variación genética entre distintas poblaciones de la misma especie, así también dentro de una población.

1.4.1 Riqueza de alelos

La diversidad genética dentro de una población o una especie puede ser dada como el número y abundancia de alelos (FAO, 2003).

1.4.2 Frecuencia alélica

La constitución genética de una población se describe por medio del arreglo de las frecuencias alélicas también llamada frecuencia génica. Esta es el resultado de dividir el número de alelos iguales, en una población, entre el número total de alelos.

Para el cálculo de las frecuencias alélicas se realiza un recuento directo de los alelos presentes y se asume que la presencia de un solo alelo corresponde a un homocigoto, por tanto no se considera la presencia de alelos nulos.

1.4.3 Contenido de índice polimórfico (PIC)

Fue introducido por Botstein y et al. en 1980, como indicador de la calidad de un marcador en estudios de cartografía genética (Martínez y Vega, 2002), pero en la actualidad se usa para la valoración de la calidad de un marcador para estudios genéticos ya que refleja el polimorfismo detectado.

El PIC estima el poder de discriminatorio de un locus al tomar en cuenta, no sólo el número de alelos que están expresados, sino también las frecuencias relativas de los alelos (Andrade, 2001). Según Botstein, los valores de PIC superiores a 0.5 son informativos, los comprendidos entre 0,25 y 0,5 son medianamente informativos y poco informativos los inferiores a 0,25 (Zamorano, 1998).

1.4.4 Heterocigosidad

Es una de la mejores valoraciones de variación genética de una población, se define como la proporción de individuos heterocigotos para un locus en una población (Martínez y Vega, 2002). Weir (1996) indica que el conocimiento de la frecuencia de heterocigotos es importante en el estudio de la diversidad, en la medida de que cada heterocigoto lleva diferentes alelos, lo cual muestra la existencia de variación genética en una población (Zucchi, 2002).

Generalmente se calculan la heterocigosidad observada y heterocigosidad esperada. La primera es la proporción de individuos heterocigotos observados en una muestra, y es calculada a partir de los genotipos encontrados de la población para un locus o para todos los loci (Martínez y Vega, 2002).

La heterocigosidad esperada, referida como diversidad genética, se define como la probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar en una accesión dada sean diferentes, corresponde a la proporción de heterocigotos en el equilibrio de Hardy-Weinberg y se calcula a partir de las frecuencias alélicas.

$$He = 1 - \sum_{i=1}^K X_i^2$$

Donde:

X_i^2 = Frecuencia del i-esimo alelo

1.4.5 Diferenciación genética

En el análisis de diversidad genética en poblaciones subdivididas pueden ser calculados los llamados F estadísticos, también conocidos como índices de fijación, que permiten medir la divergencia genéticas entre medidas de

heterocigosidad de las subpoblaciones (índice de fijación entre subpoblaciones = F_{st}), así también el grado de reducción de heterocigosidad dentro de una población (índice de fijación dentro de una subpoblación = F_{si}) y la disminución global de heterocigosidad (índice de fijación para una población F_{it}) respecto a la población total (Fondevila y Moya, 1999).

El índice de fijación de los individuos dentro de una subpoblación (F_{si}), estima la desviación de las frecuencias genotípicas (heterocigotos, homocigotos) observadas respecto a las esperadas considerando el equilibrio Hardy-Weinberg. En el caso de las subpoblaciones en equilibrio de Hardy-Weinberg este coeficiente es cero y puede ser negativo debido a un exceso de heterocigotos (Fondevila y Moya, 1999).

El índice de fijación entre subpoblaciones (F_{st}), es la medida de la distancia genética entre subpoblaciones; este muestra como las frecuencias en dos poblaciones se desvían. El valor es cero cuando todas las poblaciones tienen la misma frecuencia genética y es 1 cuando las subpoblaciones están fijadas para distintos alelos. (Murray, 1996).

El índice de fijación para una población (F_{it}), mide la correlación de alelos para la población entera y es así la combinación dentro y entre poblaciones, también muestra la disminución global de heterocigosidad individual respecto a la población total (Fondevila y Moya, 1999). Permite medir la desviación de las frecuencias genotípicas observadas en la población total respecto a las esperadas considerando que existe equilibrio Hardy-Weinberg (Martínez y Vega, 2002).

1.4.6 Distancia genética

Índice de similitud

Es usado para comparar accesiones cuyas variables (alelos) son evaluadas en una escala de doble estado (presencia y ausencia). Se calcula a partir de una matriz base, comparando, de par en par, todas las accesiones contra las otras, generándose así una matriz de similitud.

Los valores varían de uno a cero, indicando el primero máxima similitud y lo contrario el segundo.

La similitud se mide mediante varios métodos, incluyendo la correlación entre objetos, una medida de asociación en otras técnicas multivariantes o mediante su proximidad en un espacio bidimensional.

Entre las medidas de asociación más usadas están los coeficientes de asociación como el Simple Matchin (SMC), Jaccard (j), Dice, etc

Coeficiente de DICE

Este coeficientes es apropiado para marcadores codominantes, ya que no considera coincidencias de ausencia (Andrade, 2001).

La fórmula del coeficiente DICE es la que siguiente:

$$DICE = \frac{2a}{2a + b + c}$$

Donde:

a: número de veces que ambos individuos tienen presente el mismo carácter (coincidencias 1-1)

b: número de veces que el primero de ellos tiene el carácter presente y el segundo ausente (1-0).

c: número de veces que el primero de ellos tiene el carácter ausente y el segundo presente (0-1).

d: número de veces que ambos individuos tienen ausente el mismo carácter comparado (coincidencias 0-0)

Árboles de distancia genética

La matriz con los índices de similitud (matriz de distancia) contiene toda la información que proporcionan los marcadores genéticos estudiados acerca de la relación entre las accesiones analizadas, pero es difícil interpretarla, por lo que esos datos son usados para un análisis de agrupamiento y mediante representaciones gráficas, llamados árboles genéticos o dendogramas, facilitándose así la interpretación. Por tanto un dendograma es la representación gráfica de la matriz de similitud.

Existen dos métodos para construir dendogramas: Fenético y Cladístico. El segundo método contiene información acerca de la ascendencia y por tanto pueden usarse para estudios de comportamiento evolutivo. Con el método fenético se obtienen árboles filogenéticos considerando el conjunto de similitudes fenotípicas. En estos árboles se clasifican organismos basándose sólo en el número absoluto de caracteres que comparten, utiliza algoritmos rápidos y tienen propiedades estadísticas más adecuadas para datos moleculares (Martínez y Vega, 2002).

Los microsatélites al tener un grado relativamente alto de heterocigosidad y muchos alelos para cada locus, permiten definir cada individuo de forma casi inequívoca, lo que implica que se obtienen resultados significativos de alelos compartidos entre individuos (Martínez y Vega, 2002).

Para construir árboles con el método fenético se usan algoritmos de agrupamiento como el UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic average) y el NJ (Neighbor joining).

UPGMA

En este método, las distancias entre cluster (grupos) R y Q es tomada del promedio de todas sus distancias.

1.4.7 Coeficiente de correlación cofenética (r)

Es la medida de distorsión de un árbol genético con respecto a su Matriz de similitud. Mide el grado de ajuste entre la matriz cofenética que representa el árbol genético y la matriz de distancia que le dio origen, de acuerdo al método de agrupamiento utilizado (Rohlf, 1993).

Con este análisis se determina el nivel de correlación del producto-momento "r", si este es superior a 0,8 se dice que la representación de la matriz de similitud por el árbol genético, es buena (Rohlf, 1993).

1.4.8 Bootstrapping

Es una técnica estadística de remuestreo de datos de loci que permite dar los valores fiables (%) de los grupos en un árbol genético y dotan al mismo tiempo de un alto grado de confianza (Martínez y Vega, 2002).

Este análisis implica la creación de un lote de datos realizando un muestreo aleatorio de N caracteres o loci y reemplaza los datos originales. De esta manera se obtiene un lote de datos del mismo tamaño que le original, pero algunos caracteres quedan excluidos y otros están duplicados. La variación al azar de los resultados obtenidos de analizar estos lotes de datos remuestreados estadísticamente, es la típica que se conseguiría si se obtuvieran nuevos lotes de datos (Martínez y Vega, 2002).

1.4.9 Distribución geográfica

Se han diseñado sistemas como los SIG (sistemas de información geográfica) para el manejo simultáneo de datos espaciales en forma gráfica y datos no espaciales, relacionados con adjuntos lógicos (Guarino, Ramanatha y Reid, 1995).

Los SIG son aplicados, aparte de otros, en manejo de recursos naturales, en este tema se ha desarrollado un programa muy útil, DIVA-GIS, con el cual se hacen análisis de base de datos de colecciones biológicas como bancos de germoplasma y herbarios para dilucidar los patrones genéticos, ecológicos y

geográficos en la distribución de especies cultivadas y nativas (Hijmans y et al., 2002).

Entre las funciones analíticas del DIVA-GIS se incluyen el mapeo de riqueza y diversidad de especies basados en datos de marcadores moleculares. Con esta función se analizan datos de presencia y ausencia utilizando las distancias genéticas calculadas con los índices de Jaccard, Nei y Li, y Sokal y Michener (Hijmans y et al., 2002).

Jaccard (1908):
$$J_{xy} = 1 - \frac{n_{11}}{n_{11} + n_{10} + n_{01}}$$

Nei y Li (1978):
$$NL_{xy} = 1 - \frac{2xn_{11}}{2xn_{11} + n_{10} + n_{01}}$$

Sokal y Michener (1958):
$$SM_{xy} = 1 - \frac{n_{11} + n_{00}}{n_{11} + n_{10} + n_{00}}$$

Donde:

n_{11} = número de bandas compartidas por los genotipos x e y (par positivos)

n_{10} = número de bandas presentes en x, y ausentes en y

n_{01} = número de bandas presentes en y, y ausentes en x

n_{00} = número de bandas ausentes tanto en x como en y (par negativo)

CAPÍTULO II

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Material biológico

Se analizaron 100 accesiones de *Manihot esculenta* Crantz “yuca” conservadas por la SUDIRGEB – INIEA. Estas fueron colectadas en la región Ucayali durante el periodo 2002 a 2003 en el marco del proyecto “Modelos de diversidad y erosión genética de los cultivos tradicionales de Perú y accesoria rápida utilizando las herramientas del GIS”.

Las muestras analizadas corresponden al 33,9% (Tabla 1) del total de accesiones colectadas en ocho sectores (Figura 4) distribuidos en tres cuencas (Aguaytía, San Alejandro y Ucayali) y márgenes de una carretera (San Alejandro) en la región Ucayali de Perú (Figura 5). Asimismo, las 100 accesiones provienen de dos grupos socioculturales: comunidades de nativos (CCNN) y comunidades de colonos (CCCC).

Tabla 1. Número de accesiones colectadas y analizadas por sector, cuenca, carretera, y grupo sociocultural.

Cuenca / carretera	Sector	Número accesiones					
		CCNN		CCCC		Total	
		Colectadas	Analizadas	Colectadas	Analizadas	Colectadas	Analizadas
Aguaytía	I	22	7	22	4	44	11
	II	0	0	23	13	23	13
	III	6	3	21	7	27	10
San Alejandro	IV	42	8	23	5	65	13
Carretera San Alejandro	V	0	0	50	13	50	13
Ucayali	VI	4	3	17	8	21	11
	VII	18	9	1	1	19	10
	VIII	28	13	18	6	46	19
Total	N	120	43	165	57	295	100
	%		35,8333		34,5454	100	33,8983

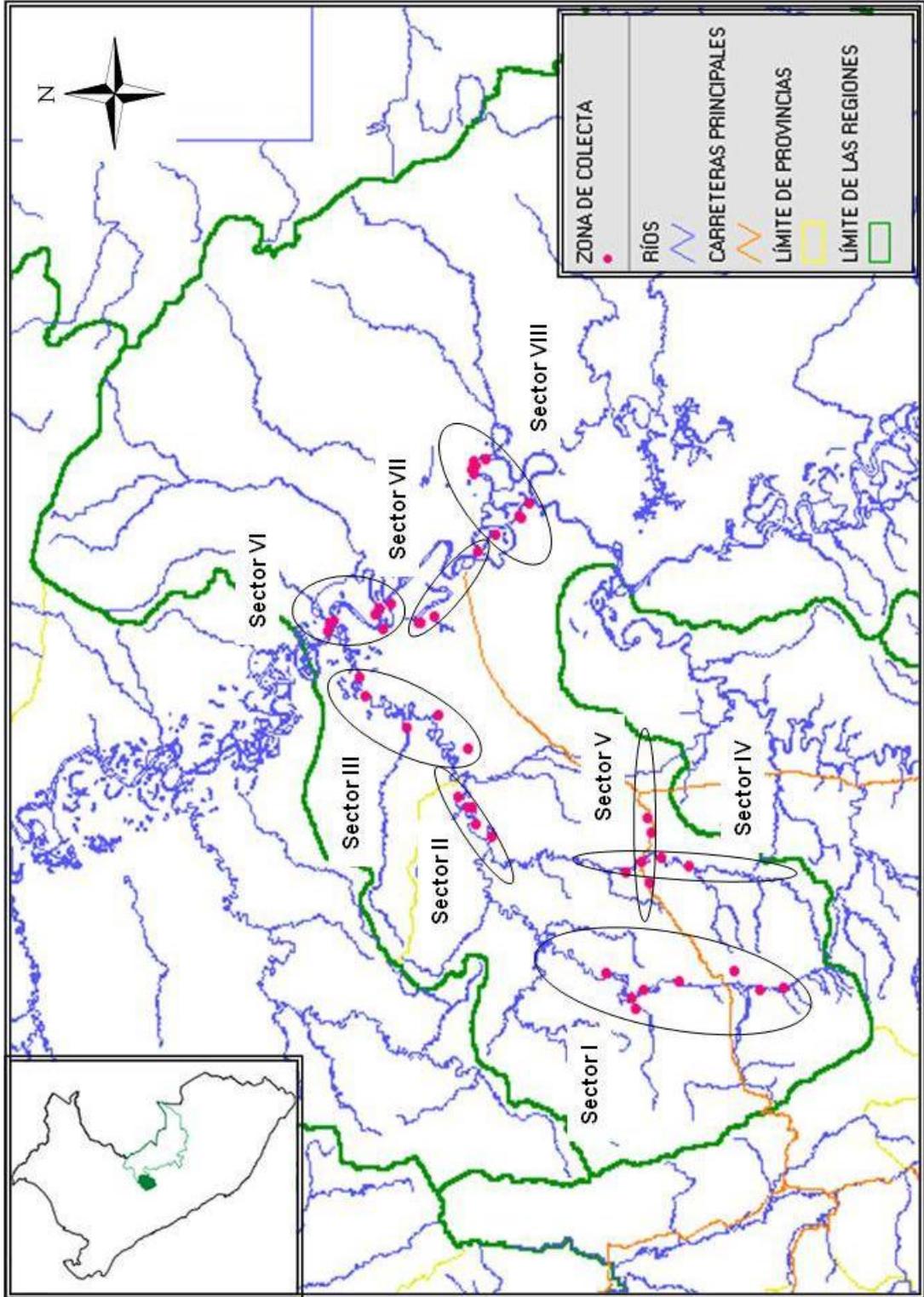


Figura 4. Distribución de los sectores de colecta de *Manihot esculenta* Crantz en Ucayali.

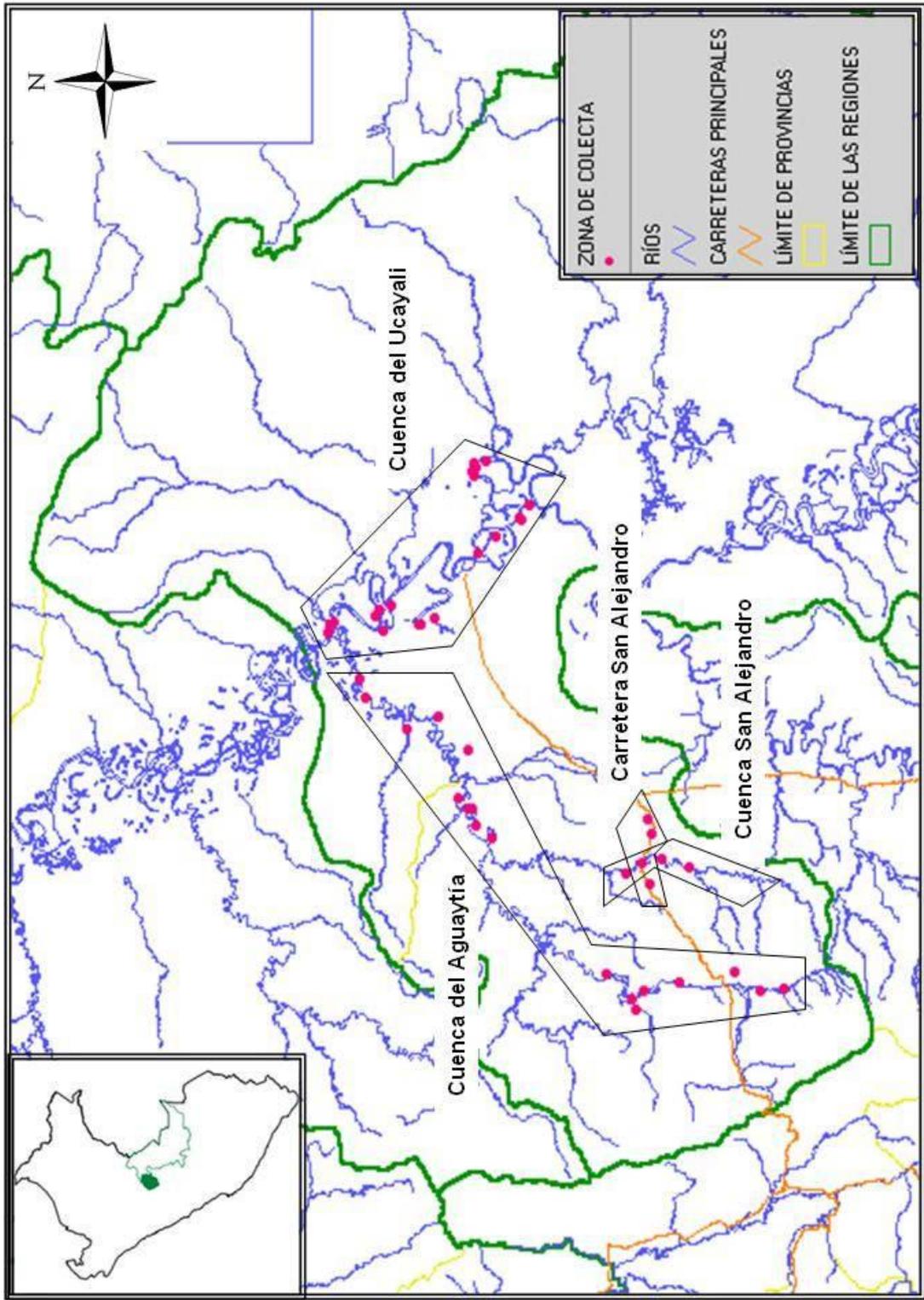


Figura 5. Área de colecta en las cuencas: Aguaytia, Ucayali y San Alejandro; y Carretera San Alejandro.

2.1.1 Siembra de accesiones de yuca

Con la finalidad de obtener hojas tiernas para la extracción de ADN, se sembró estacas de las 100 accesiones en el invernadero de la Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB) del INIEA (Figura 6). Las estacas fueron cortadas de manera que contengan 6 a 7 nudos (15 a 20 cm aproximadamente), luego fueron esterilizadas con benlate (0,2%), para proceder con la siembra en bolsas negras de polietileno (30 x 25,5 cm) que contenían sustrato esterilizado (arena y compost 1:1).



Hojas usadas para
extracción de ADN



Figura 6. Accesiones de yuca cultivadas en el invernadero (a) y partes de la planta usada para la extracción de ADN (b).

2.2 Identificación de marcadores SSR

Para la identificación de los marcadores SSR y obtener los datos para el análisis de diversidad y distribución espacial de germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz (yuca) de las accesiones colectadas en Ucayali, se siguieron los siguientes pasos que se detallan a continuación.

2.2.1 Selección de iniciadores

Para la amplificación de los marcadores SSR se seleccionaron 25 iniciadores (Tabla 2) de 36 recomendados por el Dr. Fregene (CIAT, comunicación personal) para estudios de diversidad genética en yuca, y además se tomó en cuenta el contenido de índice polimórfico (PIC) calculado a partir de datos de 31 iniciadores usados por Eke-Okoro y et al. (2002) en el estudio: "Genetic Diversity of Cassava Landraces from Nigeria as Assessed by Simple Sequence Repeat (SSR) Markers" (www.ciat.cgiar.org/molcas/).

2.2.2 Extracción de ADN

El ADN nuclear fue obtenido de las hojas apicales, según el método CTAB (Bromuro de cetil-trimetil-amonio) de Doyle y Doyle, 1990 (Ghislain et al., 1997)), modificado por el Laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB del INIEA.

El método consta de 5 etapas. La primera consiste en la ruptura mecánica de las paredes y membranas celulares del material vegetal empleando nitrógeno líquido como agente desecante. La segunda fase es la incubación del tejido a 65°C en 700µL del tampón de extracción CTAB 2X (Anexo III) y 2 uL de β-mercaptoetanol. El CTAB ayuda a solubilizar las membranas lipoprotéicas, denaturar las enzimas degradativas del ADN y, forma un complejo con el ADN y el β-mercaptoetanol (presente en el mencionado tampón) protege al ADN de la actividad de las enzimas como las peroxidases y polifenoloxidasas (Andrade, 2001).

En la tercera etapa, a la suspensión anterior se agrega 700µL de cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1); el cual elimina los polisacáridos, lípidos y proteínas (Andrade, 2001) y luego se adiciona 50 µL de la solución tampón CTAB 10 X (Anexo III). En la cuarta

etapa se añade 400 μ L de isopropanol frío, para precipitar los ácidos nucleicos, haciendo visible el ADN (“pellet”) el cual es sedimentado por centrifugación a 14 000 rpm. En la quinta etapa el “pellet” es lavado 2 veces en 1 ml etanol (70% y 96% respectivamente) y resuspendido por centrifugación.

El ARN es eliminado incubando la muestra a 36°C durante una hora, usando 1 μ L de ARNasa 10 mg/ml (Anexo III).

2.2.3 Cuantificación de ADN

Para calcular la cantidad de ADN extraído se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1%, para lo cual se usó un volumen de 2 μ L de ADN de cada muestra y como patrón 10 μ L de ADN del fago lambda cortado con la enzima Pst I.

La electroforesis se llevó a cabo en una solución tampón TBE 1X (Anexo VI) y bromuro de etidio (10 mg/ml), a 100 voltios durante 2 horas aproximadamente. También fue usado (mezclada con el ADN de las muestras) el tampón de carga SALB 10X (Anexo IV), el cual tiene la finalidad de incrementar la densidad de la muestra para asegurar que el ADN sea depositado uniformemente en el pozo, asimismo da Color a la muestra lo que no sólo facilita el cargado; sino también sirve como un patrón de corrida referencial debido a los Colores visibles durante la corrida (Sambrook, 1989).

El ADN, en el gel de agarosa, fue teñido con bromuro de etidio a un 2,5% y visualizado con el captador de imágenes digitales (Stratagene, Sistema Eagle Eye™ II-CIP). El Colorante mencionado tiene la propiedad de intercalarse con el ADN, y la intensidad de fluorescencia inducida por la luz UV, del captador de imágenes, es proporcional a la cantidad de ADN.

La cantidad de ADN de cada muestra fue estimada por comparación con la primera banda del fago, el cual equivale a 280 ng, para luego llevarlas a una concentración uniforme de aproximadamente de 10 ng/ μ L (Figura 7).

Tabla 2. Iniciadores seleccionados para la amplificación de marcadores SSR de 100 accesiones de *Manihot esculenta*.

SSR locus	Type of repeat*	Left primer*	Right primer*	PIC
SSRY100	(CT)17TT(CT)7	ATCCTTGCCTGACATTTTGC	TTCGCAGAGTCCAATTGTTG	0,74
SSRY101	(GCT)13	GGAGAATACCACCGACAGGA	ACAGCAGCAATCACCATTTT	0,74
SSRY106	(CT)24	GGAAACTGCTTGACAAAAGA	CAGCAAGACCATCACCAGTTT	0,56
SSRY12	(CA)19	AACTGTCAAACCATTCTACTTGC	GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	0,63
SSRY135	(CT)16	CCAGAAACTGAAATGCATCG	AACATGTGCGACAGTGATTG	0,63
SSRY161	(CT)11TT(CT)21(CA)19	AAGGAACACCTCTCCTAGAATCA	CCAGCTGTATGTTGAGTGAGC	0,62
SSRY164	(GA)29	TCAAACAAGAATTAGCAGAACTGG	TGAGATTTTCGTAATATTCATTT CACTT	0,76
SSRY177	(CCT)6CT(N)65(CT)4 AT(CT)18	ACCACAAACATAGGCACGAG	CACCCAATTCACCAATTACCA	0,64
SSRY179	(GA)28	CAGGCTCAGGTGAAGTAAAGG	GCGAAAAGTAAGTCTACAACCTT TTCTAA	0,75
SSRY180	(GA)16(G)4(GA)5	CCTTGGCAGAGATGAATTAGAG	GGGGCATTCTACATGATCAAT AA	0,65
SSRY181	(GA)22(G)3C(GA)3GGA A(GA)4	GGTAGATCTGGATCGAGGAGG	CAATCGAAAACCGACGATACA	
SSRY182	(CA)17(N)31GAGG (GA)8	GGAATTCCTTTGCTTATGATGCC	TTCTTTTACAATTCTGGACGC	0,74
SSRY19	(CT)8(CA)18	TGTAAGGCATTCCAAGAATTATCA	TCTCCTGTGAAAAGTGCATGA	0,57
SSRY20	(GT)14	CATTGGACTTCTACAAATATGAA T	TGATGGAAAGTGGTTATGTCC TT	0,76
SSRY21	(GA)26	CCTGCCACAATATTGAAATGG	CAACAATTGGACTAAGCAGCA	0,58
SSRY4	(GA)16TA(GA)3	ATAGAGCAGAAGTGCAGGCG	CTAACGCACACGACTACGGA	0,76
SSRY47	(CA)17	GGAGCACCTTTTGCTGAGTT	TTGGAACAAAGCAGCATCAC	
SSRY51	(CT)11CG(CT)11(CA)18	AGGTTGGATGCTTGAAGGAA	GGATGCAGGAGTGCTCAACT	0,65
SSRY52	(GT)19	GCCAGCAAGGTTTGCTACAT	AACTGTCAAACCATTCTACTT GC	0,60
SSRY59	(CA)20	GCAATGCAGTGAACCATCTTT	CGTTTGTCTTTTCTGATGTTT	0,70
SSRY61	(CA)12	GGCTGCTTTACCTTCTACTCAGA	CAAGAACGCCAATATGCTGA	0,57
SSRY64	(CT)13CG(CT)6	CGACAAGTCGTATATGTAGTATTC ACG	GCAGAGGTGGCTAACGAGAC	0,68
SSRY69	(CT)18ATT(AT)2 (N)7 (CTTT)2	CGATCTCAGTCGATACCCAAG	CACTCCGTTGCAGGCATTA	0,65
SSRY9	(GT)15	ACAATTCATCATGAGTCATCAACT	CCGTTATTGTTCTGGTCCT	0,61
SSRY82	(GA)24	TGTGACAAATTTTCAGATAGCTTCA	CACCATCGGCATTAACCTTTG	0,69

*Datos tomados de la publicación de Stephenson y et al. (2001).

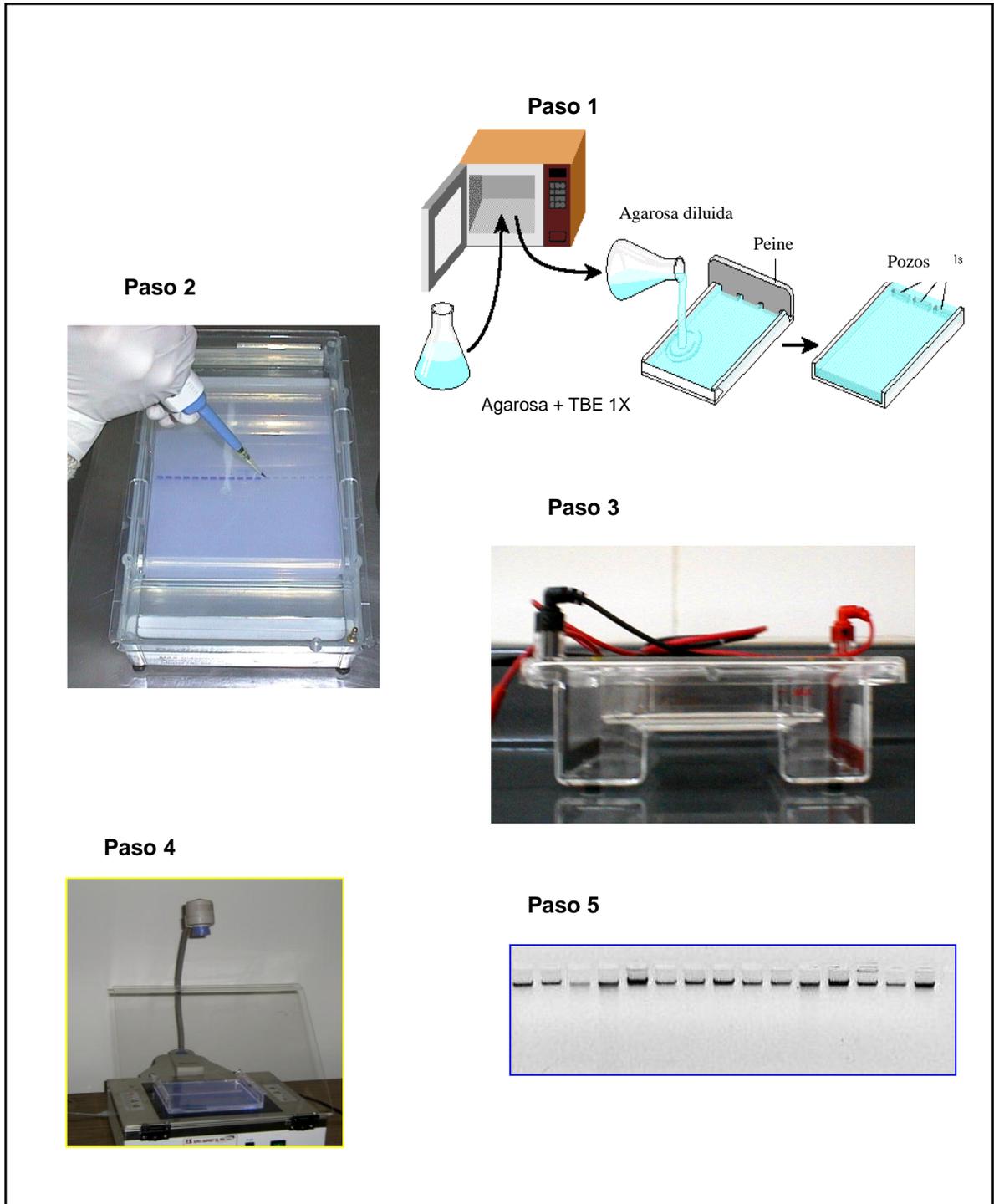


Figura 7. Resumen del proceso para la cuantificación del ADN extraído. Paso 1: Preparación del gel de agarosa, Paso 2: Cargado del gel, Paso 3: Electroforesis, Paso 4: Fotografiado del gel y Paso 5: Cuantificación del ADN.

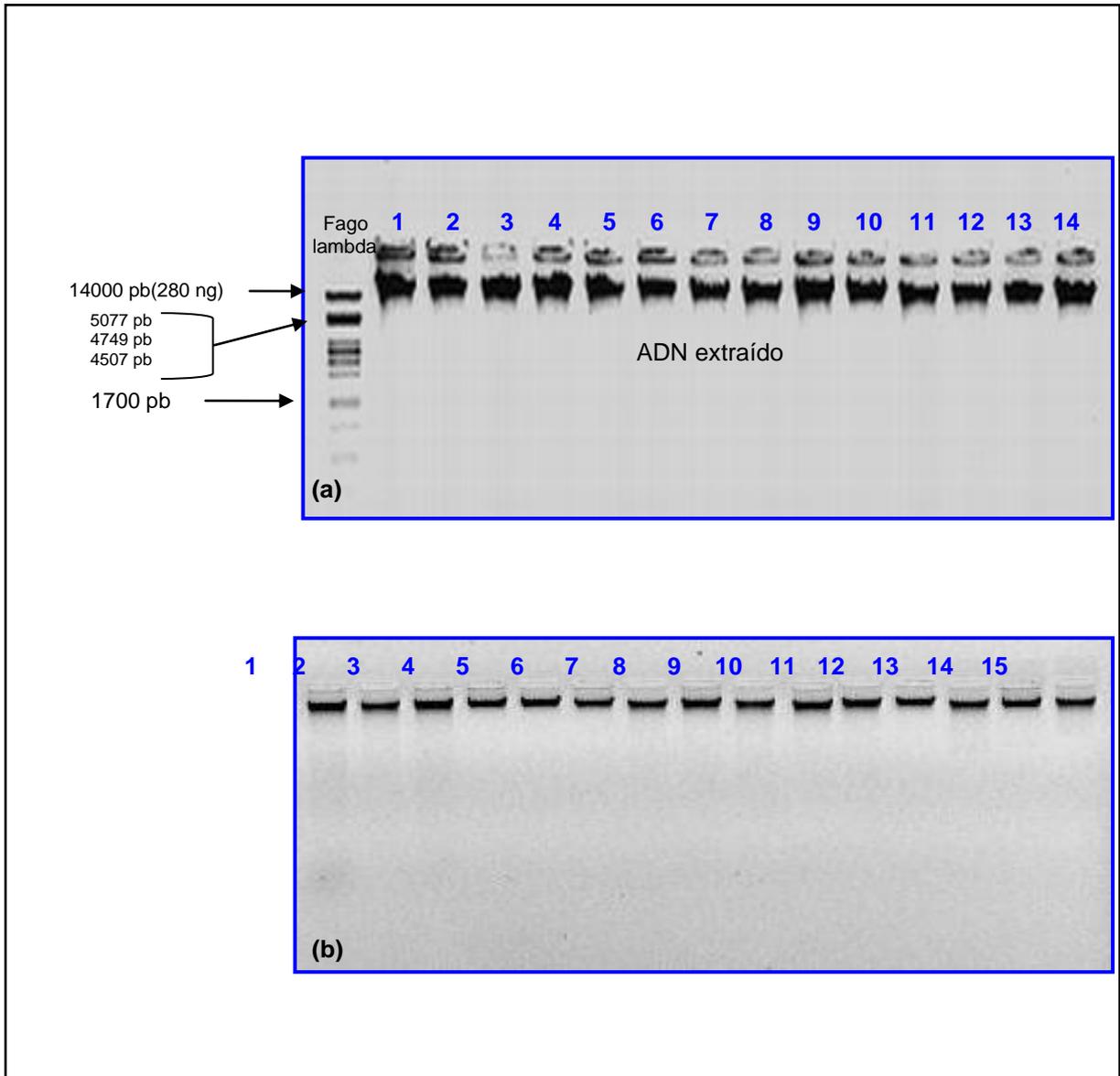


Figura 8. Calidad y cantidad de DNA extraído (a) y muestras de ADN con concentraciones uniformizadas para el análisis molecular (b).

2.2.4 Amplificación de las regiones microsatélites

Preparación del ADN molde

El ADN genómico de cada accesión, usado como molde o templado, se diluyó hasta obtener una concentración de 10 ng/ μ L en el buffer T₁₀E₁ (Anexo 3) hasta un volumen total de 100 μ L.

Protocolo de amplificación

Para la amplificación de los marcadores microsatélites, fue necesario estandarizar un protocolo a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB - INIEA (2003); con esta finalidad se tomó como base el protocolo usado en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) proporcionado por la Dra. Janeth Gutiérrez (2002; comunicación personal).

De acuerdo al protocolo estandarizado (Tabla 3), se preparó la mezcla de reacción para un volumen total de 12,5 μ L, finalmente se añadió 20 μ L de aceite mineral para evitar la evaporación de las muestras durante la amplificación.

Tabla 3. Protocolo de amplificación para una muestra de ADN de *Manihot esculenta*, estandarizado para condiciones del Laboratorio de Biología molecular de la SUDIRGEB-INIEA.

Stock	Concentración final	volumen
H ₂ O libre de nucleasas		
Tampón de reacción 10X	1X	1,25 μ L
Mg ₂ Cl 25 mM	1-1,5 mM	0,5-0,75 μ L
dNTP 2,5 mM (mix)	0,5-0,15 mM (mix)	0,25-0,75 μ L
Iniciador F 10 uM	0,2 uM	0,25 μ L
Iniciador R 10 uM	0,2 uM	0,25 μ L
Taq polimerasa 5U/uL	0,4-0,5 U	0,08-0,10 μ L
ADN 10 ng/uL aproximadamente		1,50- 2,5 μ L

Programa de amplificación

Las amplificaciones de las regiones microsátélites (figura 8) fueron llevadas a cabo en un termociclador Perkin Elmer-2 400, mediante el programa YUCA-DIV (Fregene, comunicación personal), estandarizado para condiciones del laboratorio e iniciador.

El primer ciclo es de denaturación previa a 94°C por un periodo de 2 a 3 minutos. La siguiente fase consta de 30 ciclos, cada uno presenta tres etapas: la primera (denaturación) a 94°C por 30 segundos para separar las hebras del ADN molde y del iniciador, la segunda es de 55 a 60°C ($T_{\text{unión}}$ ó annealing), dependiendo de cada par de iniciadores, por 1 minuto y la última (extensión) es a 72°C por 1 minuto, para que la taq polimerasa realice la síntesis. La última fase (extensión final) es un ciclo de extensión a 72°C por 5 minutos.

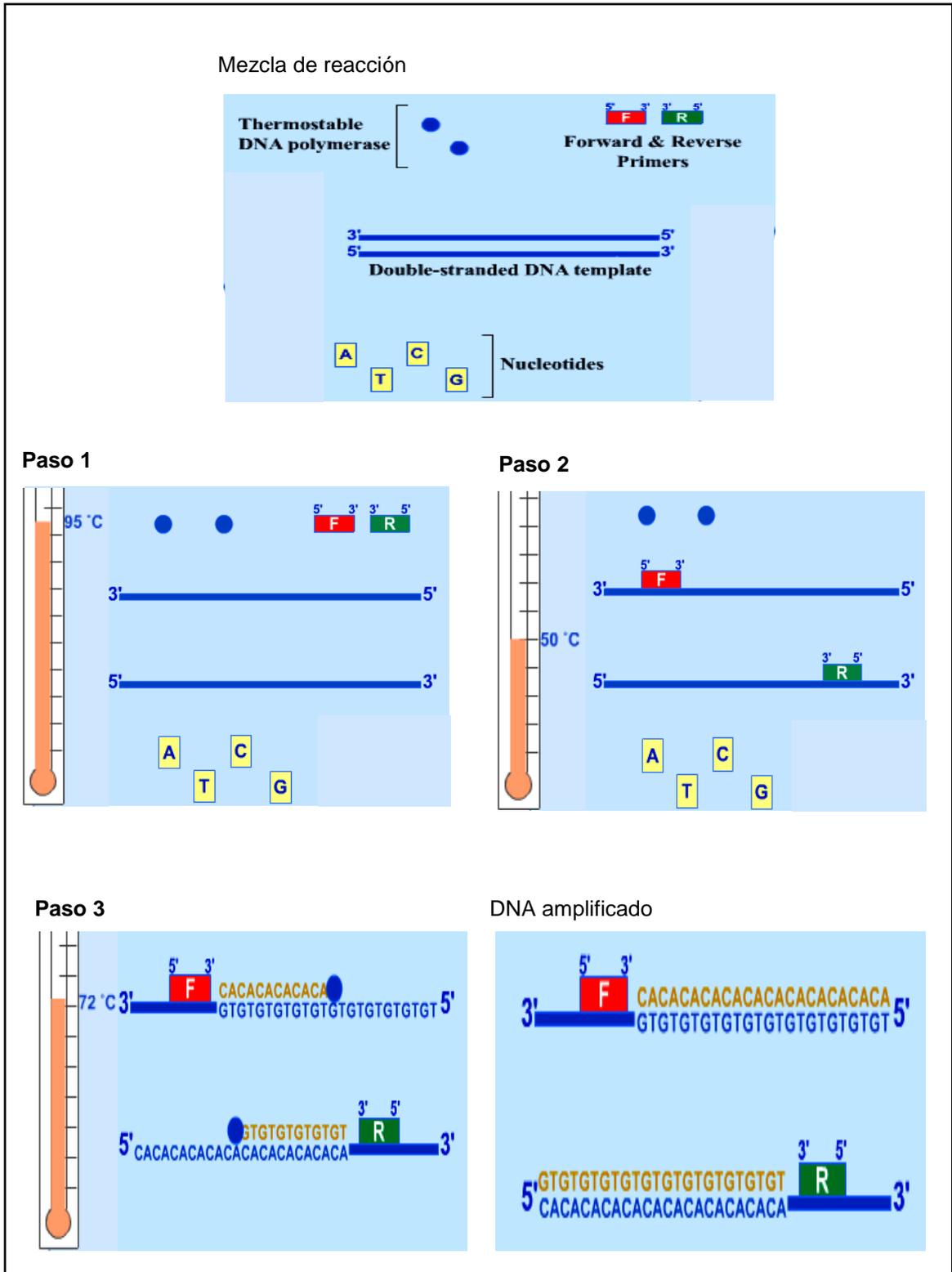


Figura 9. Pasos básicos de la reacción en cadena de la polimerasa-PCR (Pathology Homepage, 2001, www.pathology2.jhu.edu/molec/techniques). Paso 1: denaturación, paso 2: annealing y paso 3: extensión.

2.2.5 Electroforesis de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron separados en geles denaturantes de poliacrilamida (Acrilamida al 6%, Urea 7M) mediante electroforesis vertical en un sistema de secuenciamiento modelo S2 (Gibco). Para ello se siguieron los siguientes pasos:

Preparación del gel de poliacrilamida

Se limpiaron las placas de vidrio con alcohol y papel toalla antes de aplicar los respectivos reactivos. A la pequeña, se le impregnó una solución adherente (4,7 μ L de silano adhesivo, 4,7 μ L de ácido acético glacial y 1,5 ml de etanol al 70%). Kopps (1993), citado por Andrade (2001), indica que una porción del silano adhesivo interactúa con la placa de vidrio y la otra parte polimeriza con el gel, lo que permitiría la adhesión del gel al vidrio. El otro vidrio fue tratado con Dimethyldiclorosilan para impedir la adhesión del gel.

Luego de 30 minutos, los vidrios fueron ensamblados con los separadores y sujetadores. Inmediatamente, en el molde preparado, se vertió la solución de poliacrilamida (60 ml de solución de acrilamida al 6% urea 7M (Anexo V), 360 μ L de persulfato de amonio al 10% y 36 μ L de Temed), a continuación, se colocaron los respectivos peines. Para que el gel pueda ser usado, se dió un tiempo mínimo de 2 horas para su polimerización.

Instalación y pre-electroforesis del gel

Se colocó en la cámara de electroforesis vertical el molde con el gel, sin los sujetadores, y libre de residuos de gel. En seguida se vertió 500 ml, aproximadamente, de tampón TBE 0,5X en los compartimientos inferior y superior. Luego se hizo una precorrida a 1600 voltios por 30 minutos aproximadamente.

Marcador de peso molecular

El peso de los marcadores fue determinado por medio de la ubicación de las bases de la reacción de secuenciamiento del plásmido pUC 18 (productos de

restricción del plásmido cortado con la enzima Pst I) (Anexo VII). Para esto se corrió junto a las muestras la mencionada reacción (figura 11).

Denaturación

Las muestras, así como la reacción de secuenciamiento, fueron denaturadas a 95°C por 5 minutos, antes de ser cargadas en el gel, pero previamente se les añadió el tampón de carga para geles de poliacrilamida (50% del volumen de la muestra) con la finalidad de darle mayor densidad a la muestra, estabilizar las condiciones denaturantes por medio de la formamida al 96% y contar con un patrón de colores como referencia de peso molecular. El azul del xilén cianol, en acrilamida al 6 %, corresponde a 110 pb.

Cargado y corrida electroforética de las muestras

Se cargaron 7,5 µl del producto amplificado y denaturado (Figura 9), así también 4,5 µl de la reacción de secuenciamiento. El tiempo de corrida promedio fue de 4 a 5 horas a 1600 voltios. El tiempo de corrida varió de acuerdo al tamaño referencial de los marcadores para facilitar la identificación y determinación del peso de los alelos, para la mejor separación electroforética de los marcadores y de la reacción de secuenciamiento en un periodo de tiempo.

2.2.6 Tinción con nitrato de plata

Para visualizar las bandas amplificadas (figura 9) se utilizó un protocolo de tinción no radioactiva: tinción con nitrato de plata, el cual cuenta de los siguientes pasos.

Fijación

Una vez transcurrido el tiempo de corrida, fue separado el vidrio más pequeño, el cual lleva adherido el gel para ser sumergido en una solución de ácido acético al 10% en agitación durante 30 minutos aproximadamente.

La fijación es un paso que evita la difusión de las moléculas de ácido nucleico separadas en la matriz del gel, también ayuda a remover y neutralizar químicos indeseados (como la urea y el tampón de corrida) (Andrade, 2001).

Lavado del gel

En seguida, el gel fue sometido a dos enjuagues con agua destilada, en agitación durante 5 minutos cada uno. Este paso remueve remanentes de componentes solubles del gel que se quedan después de la fijación y que interfieren con la tinción

Impregnación de la plata

El gel, con las secuencias microsatélites ya fijado, fue colocado en una solución de nitrato de plata al 0,1% en agitación por 30 minutos. En esta etapa según Caetano-Anolles (1994) y Kopps (1993), citados por Andrade (2001), el ión de plata reacciona con las bases del ADN y la presencia del formaldehído da sensibilidad y contraste; además este último, probablemente, reduce la plata a un nivel muy bajo pero lo suficiente como para producir sitios de nucleación inicial alrededor del sustrato de tinción (Andrade, 2001).

Lavado post-impregnación

Después de colocar el gel en la solución de nitrato de plata, se procedió a un enjuague con agua destilada durante 7 segundos aproximadamente. Este paso es realizado para eliminar remanentes de plata que pueden causar precipitados marrones en la solución durante el revelado. Además, de esta manera, se reduce la concentración de plata en la superficie del gel mejorando el contraste en el revelado, pero enjuagues prolongados disminuyen la intensidad de las bandas.

Revelado

En este paso, el gel es sumergido y agitado en una solución reveladora (carbonato de sodio 3%, tiosulfato de sodio 0,0002% y formaldehído 0,054%), de pH alcalino, hasta obtener la intensidad y contraste deseados de las bandas que corresponden a los microsatélites (Figura 9). El medio fuertemente alcalino, dado por el carbonato, facilita la reducción de la plata a su estado metálico, el que es depositado en las proximidades inmediatas; y el tiosulfato disuelve sales de plata insolubles por formación de complejos, removiendo los iones de plata de la superficie del gel lo que permite un teñido más específico (Bassam y et al., 1990).

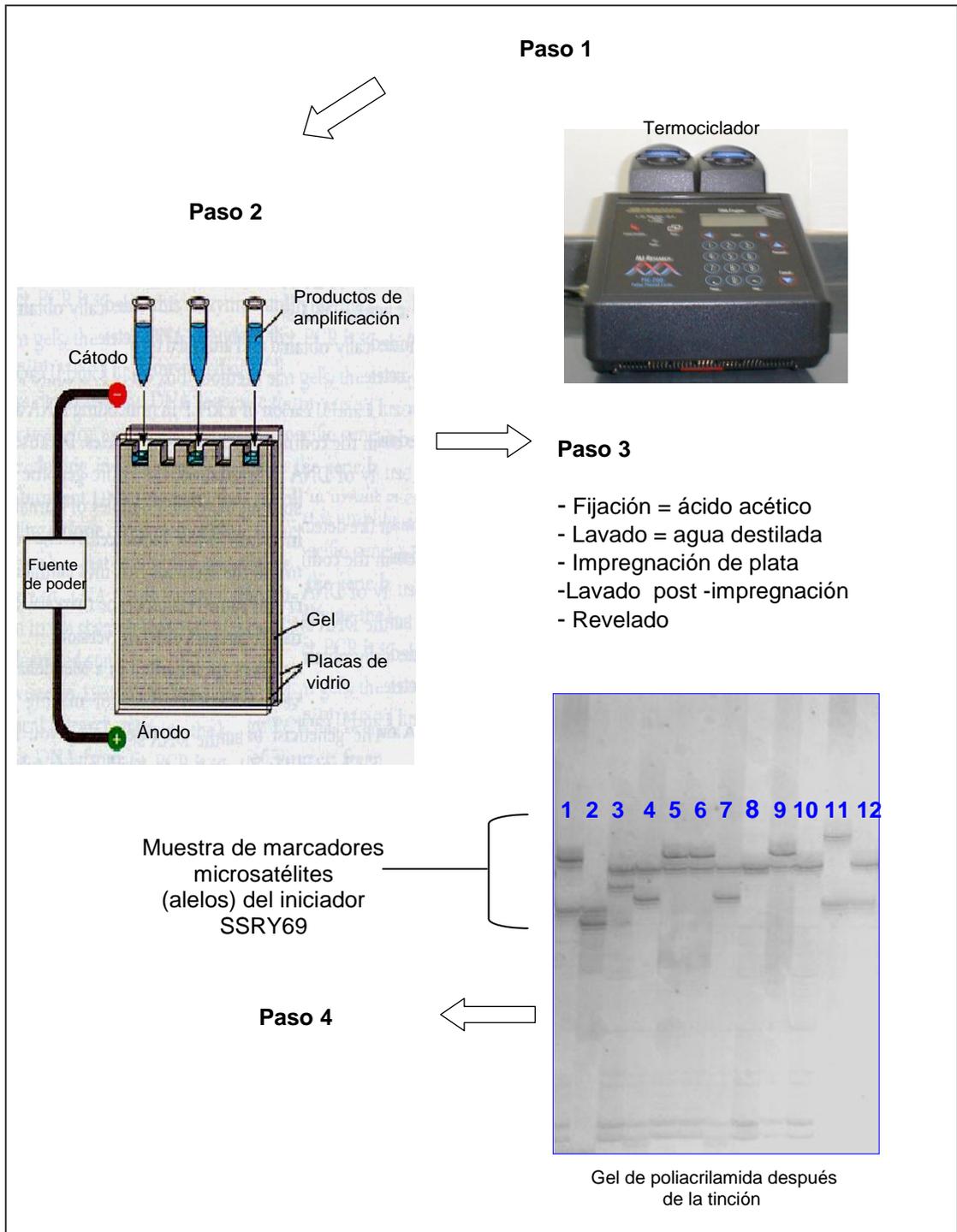
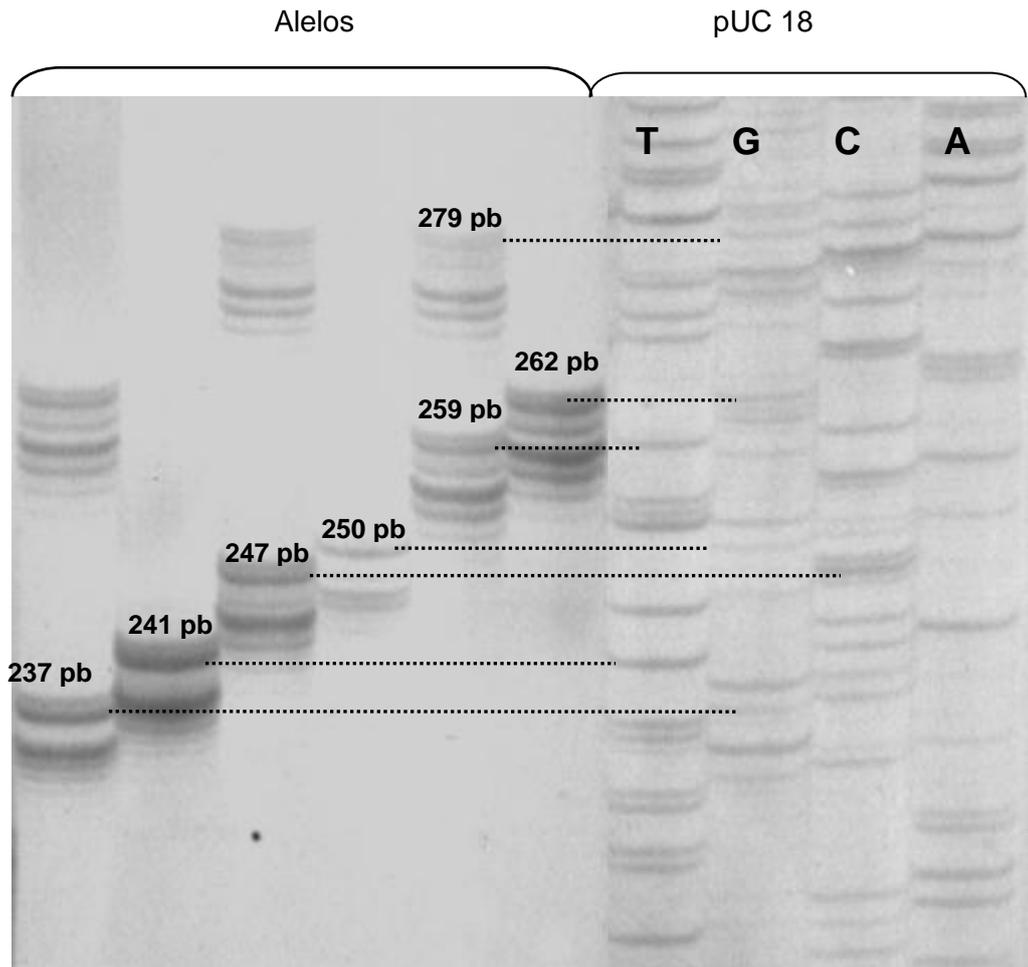


Figura 10: Resumen del proceso para visualizar regiones microsatélites. Paso 1: Amplificación de marcadores microsatélites por PCR, paso 2: Cargado en gel de poliacrilamida para la electroforesis vertical, paso 3: Tinción con nitrato de plata, paso 4: Registro de presencia "1" o ausencia "0" de alelos.

2.2.7 Determinación del tamaño de los alelos

Se determinó el tamaño de los marcadores microsatélites de cada locus (Anexo VIII) por comparación de la ubicación de éstos con las bases del sistema de secuenciación de ADN pUC 18 (Anexo VII), como se muestra en la figura 11.



<u>SECUENCIA DEL pUC 18 (200 pb – 299 pb)</u>				
GTGCCTAATG	AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	CTCACTGCC
200			237	241 247
GCTTTCCAGT	CGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA
250	259 262	279		299

Figura 11. Plásmido de secuenciación (pUC 18 cortado con la enzima PST I) usado para determinar el tamaño de los alelos.

2.2.8 Registro de marcadores (alelos)

Los marcadores microsatélites de los diferentes iniciadores, en cada accesión, fueron registrados en una matriz de datos, en una hoja Excel, anotando como uno (1) la presencia de un marcador microsatélite (alelo), y como cero (0) la ausencia (figura 12).

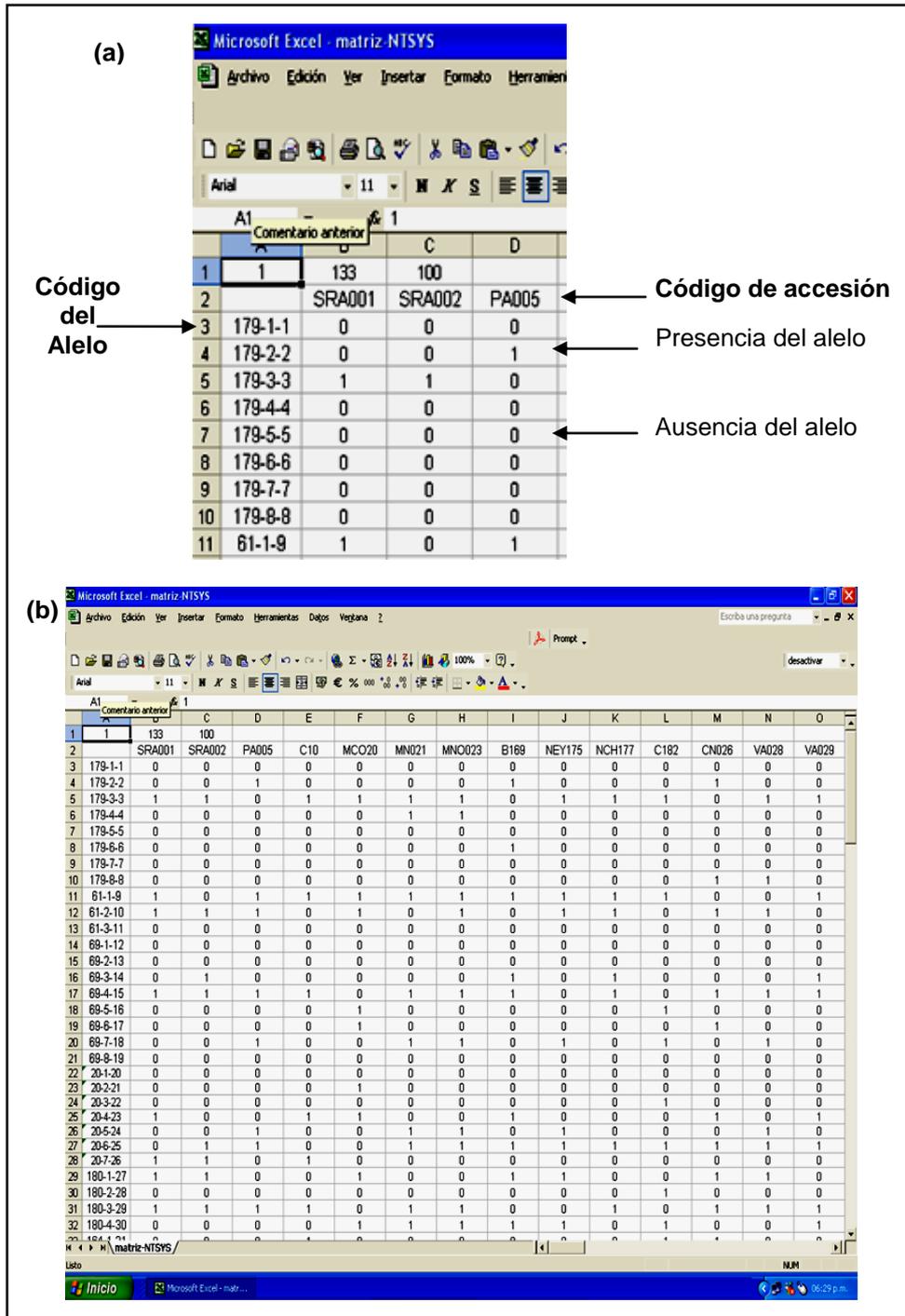


Figura 12. Registro de datos (a) y matriz de datos en hoja Excel (b).

2.3 Análisis de diversidad genética

Para el análisis estadístico se tomó en cuenta los datos de 23 iniciadores microsatélites (133 alelos) de los 25 seleccionados, debido a que uno de estos no amplificó en 23 accesiones y uno muestra marcadores no definidos. Se analizaron los datos moleculares obtenidos con métodos frecuentemente usados en estudios de diversidad genética como son: riqueza alélica, contenido de índice polimórfico, distancia genética y patrones genéticos (proporción de heterocigosidad y diferenciación genética).

En todos los análisis se incluye los datos del iniciador SSRY106 que amplificó tres alelos en 8 accesiones, debido a que los análisis no son obstaculizados por la mencionada condición dado que la matriz generada está compuesta por datos binarios y además la naturaleza tetraploide de la yuca no hace posible la exclusión de aquellas accesiones.

2.3.1 Contenido del índice polimórfico (PIC)

La capacidad discriminatoria de alelos por cada iniciador fue estimado mediante el cálculo de contenido de índice polimórfico ($PIC = 1 - \sum P_i^2$, donde P_i es la frecuencia del i ésimo alelo). La frecuencia de un alelo (P_i) es el resultado de dividir el número de alelos iguales entre el número total de alelos del locus.

2.3.2 Riqueza de alelos

La riqueza de alélica de una población se determinó por recuento directo de los alelos presentes en los individuos de dicha población, para lo cual se utilizó una matriz de datos donde está identificado cada individuo y los alelos que presenta por locus, como se muestra en la figura 12.

Además se identificó alelos poco frecuentes, considerando como tales a aquellos que tienen una frecuencia igual o menor a 0.05 en un locus (Duke, 2001)

2.3.3 Distancia genética

Para conocer la distancia genética entre las accesiones analizadas y así poder determinar la diversidad genética gráficamente e identificar los posibles duplicados, se utilizó el Software NTSYS 2.1.

Una vez obtenida la matriz de datos, se construyó una matriz de similitud usando el coeficiente de DICE, luego se procedió al análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA).

A continuación se describe los pasos a seguir para el análisis de distancia genética.

Matriz de similitud

Grabar como Microsoft Excel 4.0 la matriz de datos.

Abrir el programa NTSYS, e importar el archivo de Excel (4.0) para convertirlo a formato NTSYS.

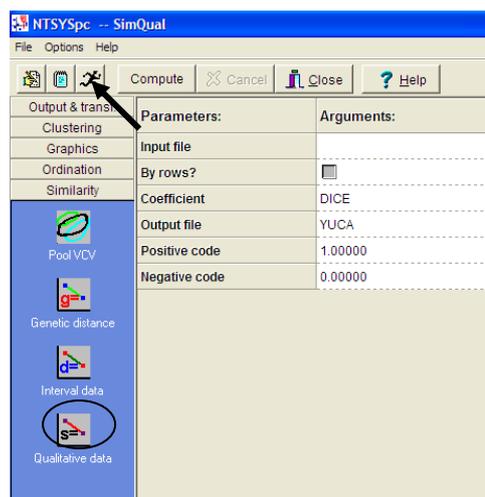
Ingresar a la ventana SimQual

Ingresar el archivo de datos

Seleccionar el índice de similitud (DICE)

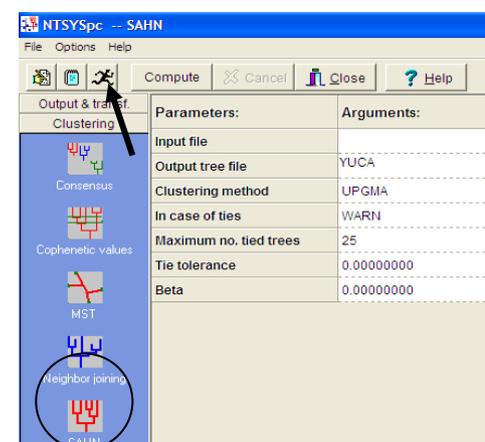
Nombrar el archivo de salida

Operar (correr el programa)



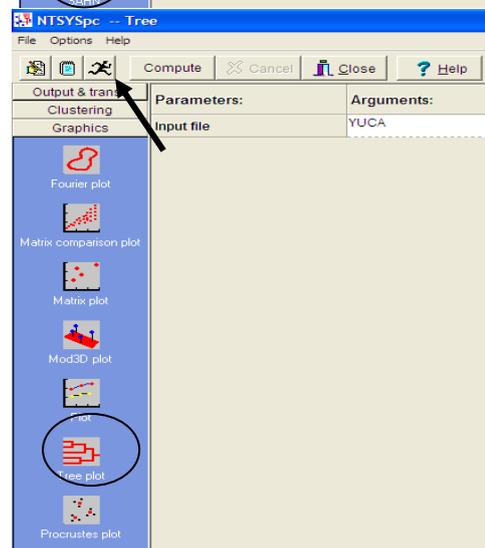
Agrupamiento

- Seleccionar la ventana Clustering
- Ingresar a la ventana SAHN
- Ingresar la matriz de similitud
- Nombrar el archivo de salida
- Seleccionar el método de agrupamiento (UPGMA)
- Operar (correr el programa)



Dendograma

- Seleccionar la ventana Graphics
- Ingresar a Tree plot
- Abrir el archivo generado en agrupamiento (UPGMA)
- Operar (correr el programa)



Correlación

Se realizó la correlación entre la matriz de similitud y la matriz cofenética generada en base a la matriz de agrupamiento (UPGMA), obteniéndose una correlación cofenética buena ($r = 0,84$). Si el valor de la correlación hubiese sido menor a 0,70 el dendograma no representaría en forma cercana las relaciones de similitud existente entre las accesiones.

Reproducibilidad

Este análisis permitió dar valores confiables a los grupos formados en el dendograma. Se realizó mediante el análisis bootstrap por 500 replicaciones usando el Software WinBoot, para determinar número de grupos considerando el porcentaje de reproducibilidad de estos.

2.3.4 Patrones genéticos

El análisis de diversidad genética expresada como heterocigosidad (H) y el de diferenciación genética (F) en un nivel (sectores y grupo socioculturales) fue realizado con datos de 23 iniciadores SSR, de acuerdo a los algoritmos definidos por Nei (1977) a partir de los F estadísticos descritos por Write (1951), citados por Zucchi (2002).

$$\hat{F}_{it} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{et}} \quad \hat{F}_{is} = 1 - \frac{\hat{H}_{ot}}{\hat{H}_{ei}} \quad \hat{F}_{st} = 1 - \frac{\hat{H}_{ei}}{\hat{H}_{et}}$$

Donde:

\hat{F}_{is} = Índice de fijación intrapoblacional

\hat{F}_{st} = Índice de fijación entre poblaciones

\hat{F}_{it} = Índice de fijación para un conjunto de poblaciones

$$\hat{H}_{ot} = \frac{\sum \sum \hat{X}_{il}}{lS} \quad \hat{H}_{ei} = 1 - \frac{\sum \sum \hat{X}_{ilk}^2}{lS} \quad \hat{H}_{et} = 1 - \frac{\sum \left(\frac{\sum \hat{X}_{ilk}}{S} \right)^2}{l}$$

Donde:

\hat{H}_{et} = Heterocigosidad esperada total (diversidad total)

\hat{H}_{ot} = Heterocigosidad observada total

\hat{H}_{ei} = Heterocigosidad esperada media total

\hat{X}_{il} = Frecuencia de heterocigositos de un locus de una población i

\hat{X}_{ilk} = Frecuencia del alelo k del locus l de una población i

s = Número de poblaciones

l = Número de locus

Dado que los 8 sectores de colecta se encuentran distribuidos en tres cuencas y al margen de una carretera, el análisis de diversidad (H) y diferenciación genética (F) dentro y entre estos (cuencas y carretera) se hizo en base a lo sugerido en la publicación: "Análisis de datos Moleculares", por Anas y Tomohiko Yoshida (2000).

1. Coeficiente de diferenciación genética para un nivel de estructura para un total de población.

$$G_{st} = \frac{H_t - H_s}{H_t} \quad (\text{Nei, 1973})$$

Donde:

G_{st} = Medida de la diferenciación relativa entre subpoblaciones (entre sectores)

H_t = Heterocigosidad en el total de la población (diversidad total)

$$H_t = 1 - \sum \overline{p_i}^2$$

$\overline{p_i}$ = Frecuencia de alelos.

2. Coeficiente de diferenciación genética para más de un nivel de estructura de una población total.

$$F_{Sr} = \frac{H_r - H_s}{H_r} \quad F_{St} = \frac{H_t - H_r}{H_t} \quad (\text{Weir y Cockerham, 1984; Nei, 1987})$$

Donde

F_{Sr} = Partición de la variación dentro de la diversidad entre subpoblaciones dentro de una región (entre sectores de una cuenca o carretera).

F_{St} = Partición de la variación entre regiones para el total de población (entre cuencas y carretera)

Los valores de diversidad genética (H) de los sectores, cuencas y carretera, y comunidades fueron expuestos a una prueba estadística no paramétrica con el test de Mann-Whitney usando el programa Minitab 13.0.

2.4 Análisis de distribución espacial

Se realizó el análisis de distribución espacial con el propósito de poder llegar no sólo a conclusiones respaldadas con varios métodos, sino también obtener más información sobre la diversidad genética de la muestra estudiada, utilizando el software DIVA – GIS (versión 3.0).

2.4.1 Distribución espacial de las accesiones con características de interés

Fue realizada empleado el software DIVA – GIS (versión 3.0) usando los datos moleculares generados en el presente trabajo y datos de pasaporte de las accesiones analizadas, proporcionado por la SUDIRGEB del INIEA (Anexo I). Con este programa se analizó las accesiones con características interesantes según el análisis de agrupamiento y los alelos poco frecuentes, para tener claro la distribución geográfica o espacial de la diversidad genética en la zona de colecta.

2.4.2 Distribución espacial de la diversidad genética

Se usó el software DIVA – GIS (versión 3.0) para conocer la riqueza y distribución de los grupos formados en el análisis de agrupamiento (en sectores, cuencas y carretera), usando la opción de conteos de clases diferentes (grupos) en cuadrículas de 0,05 km x 0,07 km. También, se realizó un análisis de riqueza genética observando las distancias genéticas de las accesiones analizadas, en cuadrículas de 0.05 km x 0.10 km; para el cálculo de dichas distancias se usó el índice de disimilitud de Nei y Li (1978).

CAPÍTULO III

RESULTADOS

3.1 Diversidad genética

3.1.1 Contenido de índice polimórfico (PIC)

El contenido de índice polimórfico promedio por locus es de 0,67 (Tabla 4), siendo los marcadores SSRY19 y SSRY20 los más discriminatorios (PIC = 0,76), es decir que detectaron el mayor polimorfismo en el germoplasma estudiado.

3.1.2 Riqueza de alelos

Se registraron un total de 133 diferentes alelos con un promedio de 6 alelos por locus (Tabla 4). En la Tabla 5, se observa que los mayores valores en número de alelos lo poseen los sectores I y IV (105 y 107 respectivamente, con un promedio de 5 alelos por locus para ambos). El sector VII presenta el menor número de alelos, con un promedio de 3 alelos por locus. Esto indica que el sector I y IV son los de mayor diversidad genética y, por otro lado, el sector VII sería el de menor diversidad genética.

Con respecto a cuencas (Tabla 6), se halló que en el grupo de accesiones de Aguaytía se presenta mayor número de alelos (121) que de Ucayali (114) y el de la cuenca San Alejandro tiene mayor número de alelos (107) que el de las márgenes de la carretera San Alejandro.

En las accesiones provenientes de las comunidades de colonos se encontró mayor número de alelos que en las procedentes de comunidades de nativos (Tabla 7).

Tabla 4. 23 loci SSR con sus respectivos rangos de peso de alelos, número de alelos identificados y contenido de índice polimórfico en 100 accesiones de *Manihot esculenta*, colectadas en Ucayali-Perú.

Código SSR	Tamaño de alelos (pb)	Número de alelos	PIC
SSRY100	192-242	9	0,7456
SSRY101	209-241	6	0,7569
SSRY106	252-281	6	0,6958
SSRY12	251-277	7	0,6076
SSRY135	242-260	4	0,6869
SSRY161	182-227	4	0,4931
SSRY164	159-188	5	0,72
SSRY177	233-274	7	0,7462
SSRY179	188-166	8	0,681
SSRY180	161-182	4	0,6615
SSRY181	187-199	5	0,7266
SSRY182	223-240	5	0,6944
SSRY19	185-225	7	0,7652
SSRY20	126-160	7	0,7659
SSRY21	165-198	3	0,6641
SSRY4	263-308	9	0,7449
SSRY51	262-303	5	0,5279
SSRY52	248-270	6	0,5972
SSRY61	224-236	3	0,4719
SSRY64	183-201	5	0,7211
SSRY69	213-253	8	0,7577
SSRY82	186-213	5	0,6355
SSRY9	254-284	5	0,6282
Total de alelos		133	
Promedio de alelos por locus		5,7826	
Promedio PIC			0,6737

Tabla 5. Alelos en 100 accesiones de *Manihot esculenta*, colectadas en 8 sectores de la región Ucayali-Perú.

locus	Número de alelos por sector								Promedio por locus
	I (11 accesiones)	II (13 accesiones)	III (10 accesiones)	IV (13 accesiones)	V (13 accesiones)	VI (11 accesiones)	VII (10 accesiones)	VIII (19 accesiones)	
SSRY100	7	5	4	8	7	4	3	4	5,2500
SSRY101	4	6	5	4	4	4	3	6	4,5000
SSRY106	4	4	4	4	3	6	4	4	4,1250
SSRY12	6	6	3	6	4	4	3	4	4,5000
SSRY135	4	4	3	3	4	3	3	4	3,5000
SSRY161	2	4	2	3	3	3	2	3	2,7500
SSRY164	5	4	5	5	5	3	3	5	4,3750
SSRY177	6	4	5	6	6	5	3	5	5,0000
SSRY179	4	3	5	3	4	4	5	5	4,1250
SSRY180	4	4	3	3	4	3	3	3	3,3750
SSRY181	5	4	4	5	5	5	5	4	4,6250
SSRY182	4	4	4	5	4	4	3	4	4,0000
SSRY19	6	5	6	6	4	6	5	6	5,5000
SSRY20	6	5	5	6	6	4	3	6	5,1250
SSRY21	3	3	3	3	3	3	3	3	3,0000
SSRY4	6	6	3	5	7	7	3	7	5,5000
SSRY51	4	4	3	3	3	3	3	3	3,2500
SSRY52	5	5	3	6	4	4	3	4	4,2500
SSRY61	2	2	2	3	2	2	2	2	2,1250
SSRY64	5	4	4	4	4	4	3	5	4,1250
SSRY69	5	6	6	7	6	5	5	7	5,8750
SSRY82	4	4	4	5	3	3	2	4	3,6250
SSRY9	4	3	3	4	5	3	3	3	3,5000
Total de alelos por sector	105	99	89	107	100	92	75	101	
Promedio de alelos por sector	4,5652	4,3043	3,8696	4,6522	4,3478	4,0000	3,2609	4,3913	4,1739

I: sector I, II: sector II, III: sector III, IV: sector IV, V: sector V, VI: sector VI, VII: sector VII, VIII: sector VIII.

Tabla 6. Alelos en 100 accesiones de *Manihot esculenta*, colectadas en 3 cuencas y márgenes de una carretera* de la región Ucayali-Perú.

locus	Cuenca o carretera				Promedio por locus
	Aguaytía (34 accesiones)	San Alejandro (13 accesiones)	Carretera San Alejandro (13 accesiones)	Ucayali (40 accesiones)	
SSRY100	7	8	7	4	6,5000
SSRY101	6	4	4	6	5,0000
SSRY106	5	4	3	6	4,5000
SSRY12	7	6	4	6	5,7500
SSRY135	4	3	4	4	3,7500
SSRY161	4	3	3	3	3,2500
SSRY164	5	5	5	5	5,0000
SSRY177	7	6	6	6	6,2500
SSRY179	7	3	4	6	5,0000
SSRY180	4	3	4	3	3,5000
SSRY181	5	5	5	5	5,0000
SSRY182	4	5	4	4	4,2500
SSRY19	7	6	4	7	6,0000
SSRY20	6	6	6	6	6,0000
SSRY21	3	3	3	3	3,0000
SSRY4	7	5	7	9	7,0000
SSRY51	5	3	3	3	3,5000
SSRY52	6	6	4	6	5,5000
SSRY61	2	3	2	2	2,2500
SSRY64	5	4	4	5	4,5000
SSRY69	6	7	6	7	6,5000
SSRY82	5	5	3	4	4,2500
SSRY9	4	4	5	4	4,2500
Total de alelos por cuenca/carretera	121	107	100	114	
Promedio de alelos por locus	5,2609	4,6522	4,3478	4,9565	4,8044

Tabla 7. Alelos en 100 accesiones de *Manihot esculenta*, según grupo sociocultural: comunidades de nativos y de Colonos, de la región Ucayali-Perú.

locus	Grupo sociocultural		Promedio por locus
	Nativos (43 accesiones)	Colonos (57 accesiones)	
SSRY100	5	9	7,0000
SSRY101	6	6	6,0000
SSRY106	5	6	5,5000
SSRY12	7	7	7,0000
SSRY135	4	4	4,0000
SSRY161	3	4	3,5000
SSRY164	5	5	5,0000
SSRY177	6	7	6,5000
SSRY179	6	7	6,5000
SSRY180	3	4	3,5000
SSRY181	5	5	5,0000
SSRY182	4	5	4,5000
SSRY19	6	7	6,5000
SSRY20	6	7	6,5000
SSRY21	3	3	3,0000
SSRY4	9	8	8,5000
SSRY51	4	5	4,5000
SSRY52	6	6	6,0000
SSRY61	3	2	2,5000
SSRY64	5	5	5,0000
SSRY69	8	8	8,0000
SSRY82	5	5	5,0000
SSRY9	5	5	5,0000
Total de alelos por grupo sociocultural	119	130	
Promedio de alelos por locus	5,1739	5,6522	5,4130

El 33% de los alelos identificados en el total de muestras son de baja frecuencia y según la tabla 8 pueden ser hallados en todos los sectores y cuencas / carretera.

Tabla 8. Alelos de baja frecuencia por locus, en 100 accesiones de *Manihot esculenta* colectadas en la región Ucayali-Perú.

Número	*Alelo de baja frecuencia	Número de accesiones con alelo de baja frecuencia	Frecuencia	Sector	Cuenca / carretera
1	179-5-5	3	0,0214	VII	Ucayali
2	179-6-6	3	0,0214	I, V	Aguaytía y carretera S. Alejandro
3	179-7-7	1	0,0071	III	Aguaytía
4	61-3-11	1	0,0079	IV	San Alejandro
5	69-1-12	8	0,044	II, III, I V, V, VI, VIII,	Aguaytía, S. Alejandro, Carretera S. Alejandro, Ucayali
6	69-2-13	8	0,044	IV, V, VII, VIII	S. Alejandro, Carretera S. Alejandro, Ucayali
7	69-3-14	8	0,044	I, II, III, IV	Aguaytía, S. Alejandro
8	69-8-19	2	0,011	IV, VIII	S. Alejandro, Ucayali
9	20-1-20	2	0,0106	IV, V	S. Alejandro, Carretera S. Alejandro
10	20-3-22	2	0,0106	I, VIII	Aguaytía, Ucayali
11	180-2-28	3	0,0174	I, II, V	Aguaytía, Carretera, S. Alejandro
12	100-3-40	8	0,050	I, III, IV, V,	Aguaytía, San Alejandro, Carretera S. Alejandro
13	100-3-41	1	0,0057	I	Aguaytía
14	100-6-44	4	0,0227	I, I, II, V	Aguaytía, carretera S. Alejandro
15	100-8-46	2	0,0114	IV, V	S. Alejandro, carretera S. Alejandro
16	100-9-47	2	0,0114	I, IV	S. Alejandro, Aguaytía
17	181-5-52	10	0,050	I, IV, V, VI, VII	Aguaytía, S. Alejandro, Carretera S. Ale., Ucayali
18	82-4-56	4	0,0247	I, II, III	S. Alejandro Aguaytía
19	82-5-57	6	0,037	III, IV, V, VIII	Aguaytía, S. Alejandro, Carretera S. Ale., Ucayali
20	101-1-58	6	0,0339	II, V, VIII	Aguaytía, Ucayali
21	101-6-63	7	0,0395	III, VIII	Aguaytía, Ucayali
22	19-5-68	4	0,0217	II, III, VIII	Aguaytía, Ucayali
23	106-1-71	2	0,0105	VI, VII	Ucayali
24	106-2-72	2	0,0105	III, VI	Aguaytía, Ucayali
25	12-1-77	2	0,0133	I, II	Aguaytía
26	12-3-79	6	0,04	II, IV, VI, VIII	Aguaytía, S. Alejandro, Ucayali
27	12-4-80	4	0,0267	I, IV, VI,	Aguaytía, S. Alejandro, Ucayali
28	182-5-92	4	0,0241	IV, V	San Alejandro, Carretera S. Alejandro
29	52-2-94	6	0,0405	II, IV, VI, VIII	Aguaytía, S. Alejandro, Ucayali,
30	52-3-95	4	0,027	I, IV, VI	Aguaytía, S. Alejandro, Ucayali
31	177-2-100	8	0,0432	I, IV, VI, VIII	Aguaytía, S. Alejandro, Ucayali
32	177-4-102	7	0,0378	I, II, III, IV, V	Aguaytía, S. Alejandro, carretera S. Alejandro
33	177-7-105	4	0,0216	III, V, VI	Aguaytía, Ucayali,
34	4-3-108	5	0,0279	II, VI, VIII	Aguaytía, Ucayali
35	4-4-109	4	0,0223	I, V, VI,	Aguaytía, Carretera S. Alejandro, Ucayali
36	4-6-111	1	0,0056	VIII	Ucayali
37	4-8-113	2	0,0112	V, VIII	Carretera S. Alejandro, Ucayali,
38	51-2-116	2	0,014	I, II	Aguaytía
39	51-4-118	1	0,007	III	Aguaytía
40	9-4-123	4	0,0241	I, V, IV	Aguaytía, S. Alejandro, Carretera S. Alejandro
41	9-5-124	5	0,0301	V, VII	Carretera S. Alejandro, Ucayali
42	64-5-129	3	0,0207	I, III, VIII	Aguaytía y Ucayali
43	161-1-130	6	0,0423	II, IV, V	Aguaytía, S. Alejandro y Carretera S. Alejandro
44	161-4-133	4	0,0282	II, VI, VIII	Aguaytía y Ucayali

*: Ver tamaño de alelos en anexo VIII

3.1.3 Análisis de distancia genética

En el dendograma (Figura 13) se observa que no hay grupos que encierran a accesiones relacionadas con procedencia geográfica, por tanto es una referencia de una alta diversidad genética en la muestra. Además se identifican 22 grupos (Figura 13), de los cuales 6 están formados por sólo una accesión (grupos unitarios). El grupo 2 cuenta con el mayor número de integrantes (21 accesiones) seguido por los grupos 1 y 3 (12 accesiones cada uno).

Se distinguen también, en la figura 13, 10 posibles duplicados (accesiones unidas por una línea azul), de los cuales se muestran algunos datos en la tabla 10. El cuarto posible duplicado es el más numeroso (8 accesiones), y además, este se halla formado en un 75 % por accesiones con el nombre local "blanco" (6 accesiones).

Si tomamos en cuenta los sectores de colecta (Tabla 9), las accesiones se encuentran distribuidas en un promedio de 7 grupos, con excepción del sector VII el cual muestra accesiones en sólo 3 grupos. Las accesiones del sector VIII se encuentran repartidas en el mayor número de grupos (9) seguido de los sectores I y IV (8), mientras que el sector VII está representado en el menor número de grupos (3). Este resultado muestra a los sectores VIII, I y IV como los de mayor diversidad genética, y por el contrario el VII como el de menor diversidad genética.

En cuanto al análisis por cuencas (Tabla 9), la cuenca del Aguaytía posee mayor número de grupos (16) que la cuenca del Ucayali (11). Mientras que entre la cuenca y carretera San Alejandro la primera es más diversa genéticamente (8 grupos).

Analizando las accesiones según grupo sociocultural (Tabla 9) se halló que las de comunidades de colonos se presentan en mayor número de grupos que las de comunidades de nativos (19 y 12 grupos respectivamente), lo cual demuestra que las accesiones de las comunidades de colonos están más distantes genéticamente una de la otra que las accesiones de las comunidades de nativos.

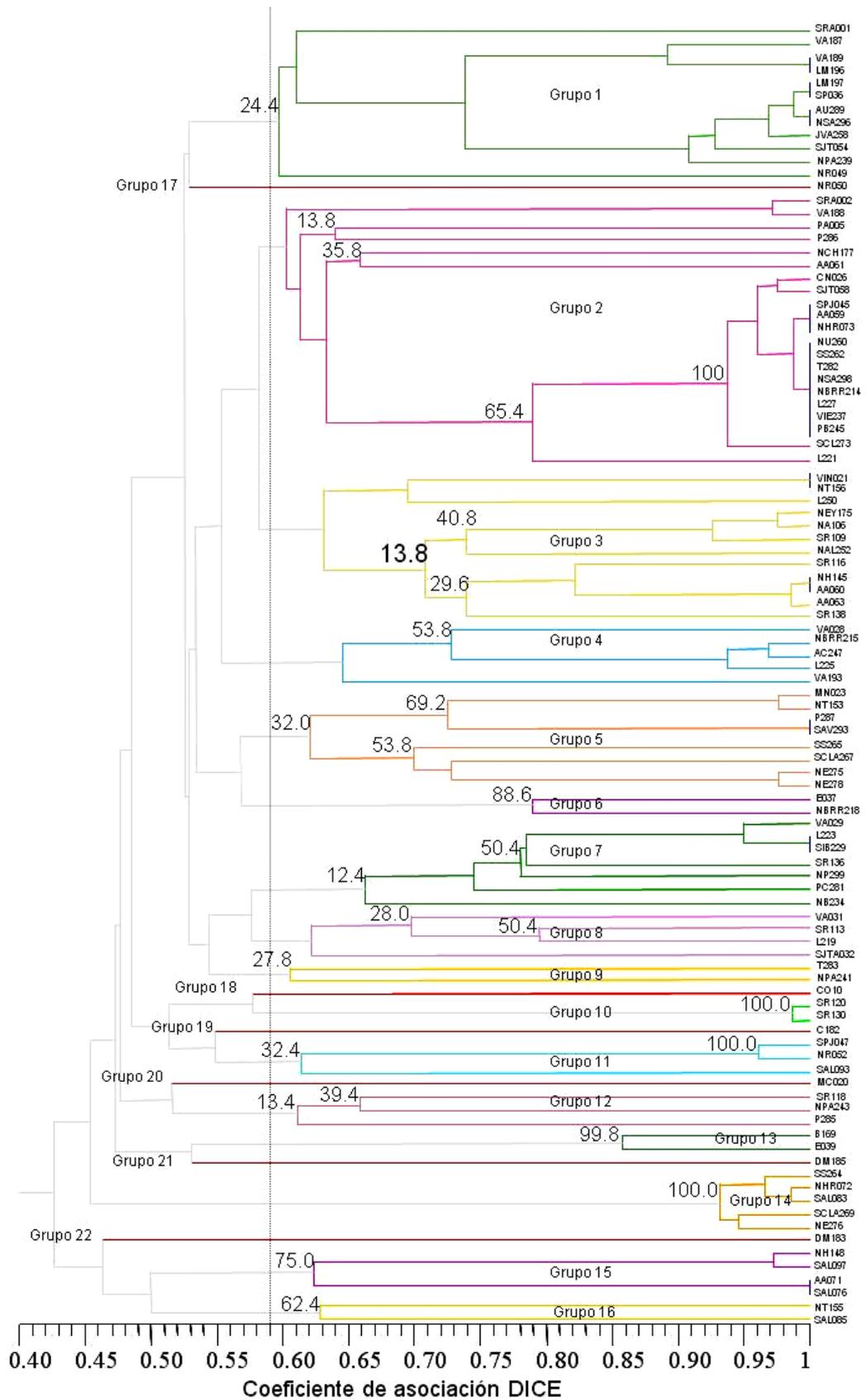


Figura 13. Dendrograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud DICE, y los valores de porcentaje Bootstrap, indicando el grado de confiabilidad de los grupos.

Tabla 9. Cuadro resumen de número de grupos por sector, cuenca, carretera y grupo sociocultural.

Grupo	Cuenca / carretera														Número de accesiones		
	Aguaytía						San Alejandro		San Alejandro		Ucayali						
	Sec. I		Sec. II		Sec. III		Sec. IV		Sec. V		Sec. VI		Sec. VII			Sec. VIII	
	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c	n	c		n	c
1	1	0	0	4	2	1	0	0	0	0	0	2	0	0	1	1	12
2	2	1	0	2	1	1	0	0	0	3	1	2	2	1	3	2	21
3	2	0	0	0	0	0	3	2	0	3	0	0	0	0	1	1	12
4	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	5
5	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	4	0	0	0	8
6	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	2
7	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	2	0	0	3	0	7
8	0	0	0	2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	4
9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	2
10	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
11	0	0	0	0	0	2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	3
12	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	3
13	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	3	0	0	0	5
15	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	0	0	0	0	4
16	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	2
C 17*	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
C 18*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N 19*	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N 20*	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
N 21*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
22*	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Grupos unitarios*	1	2	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
Grupos por sector	8		7		6		8		6		6		3		9		
Grupos por Cuenca y Carretera			16				8		6				11				100
Grupos por grupo Sociocultural y sector	7	4	0	13	33	7	8	5	0	13	3	8	9	1	13	6	
Grupos en CCNN	12																
Grupos en CCCC	19																

unidad de nativos

CCCC, c = comunidad de Colonos

Sec = sector

Tabla 10. Posibles duplicados según análisis de agrupamiento UPGMA, de 23 locus SSR, en 100 accesiones colectadas en Pucallpa de la región Ucayali-Perú.

Grupo	Posibles duplicados	Sector de colecta	Código de acceso	Nombre local de la acceso	Distrito	Localidad	Grupo sociocultural
1	1	VI	AU289	Rojo	Calleria	Alfonso Ugarte	CCCC
		VI	NSA296	Morado	Calleria	Nuevo San Antonio	CCCC
	2	II	LM197	Señorita	Curimana	Las Malvinas	CCCC
		III	SP036	Pan	Nueva Requena	Shambo el Porvenir	CCNN
	3	II	VA189	Maria	Curimana	Vista Alegre	CCCC
		II	LM196	Blanco	Curimana	Las Malvinas	CCCC
2	4	VI	T282	Blanco	Calleria	Tacshitea	CCCC
		VI	NSA298	blanco 6 meses	Calleria	Nuevo San Antonio	CCCC
		VII	NU260	Señorita	Calleria	Nuevo Ucayali	CCCC
		VII	SS262	Blanco	Parinacocha	San Salvador	CCNN
		VIII	NBRR214	Rumo	Calleria	Nueva Barranca	CCCC
		VIII	L227	Blanco	Calleria	Limongema	CCNN
		VIII	VIE237	Blanca	Calleria	Villa Esther	CCCC
		VIII	PB245	Jusho	Calleria	Puerto Bethel	CCNN
	5	III	SPJ045	Blanca	Nueva Requena	San Pablo de Juntia	CCCC
		V	AA059	Blanco	Irazola	Ascención de Aguaytillo	CCCC
		V	NHR073	Amarilla	Irazola	Nuevo Horizonte	CCCC
		6	IV	NH145	Chauche	Irazola	Nuevo Huanuco
V	AA060		Blanco	Irazola	Ascención de Aguaytillo	CCCC	
3	7	I	MN021	8 mesinos	Padre Abad	Mebanañu	CCNN
		IV	NT156	Negra	Irazola	Nuevo Tahuantinsuyo	CCCC
7	8	VIII	L223	Jusho	Calleria	Limongema	CCNN
		VIII	SIB229	blanca 6 mesinas	Calleria	Santa Isabel de Bahuanisho	CCNN
15	9	V	AA071	Morado	Irazola	Ascención de Aguaytillo	CCCC
		V	SAL076	Señorita	Irazola	San Alejandro	CCCC
	10	VI	P287	Amarillo	Yarinacocha	Panaillo	CCNN
		VI	SAV293	Amarillo	Calleria	San Antonio Viejo	CCCC

CCNN = comunidad de nativos, CCCC = comunidad de Colonos

Las 8 accesiones que amplificaron tres alelos por individuo con el iniciador 106 (Figura 14), comparten el grupo 1 en el dendograma (Figura 13). Además 7 de

ellas (LM197, SP036, AU289, NSA296, JVA258, SJT054 y NPA 239) se hallan en un mismo subgrupo con una reproducibilidad de 99,2 % (Bootstrapin por 500 replicaciones), como se muestra en la figura 15; incluso estas últimas presentan los mismos alelos (3, 4, 6), como se muestra en la figura 14, indicando que la presencia de estos alelos es una condición propia de este subgrupo y la manifestación de tres alelos en este locus es una particularidad del grupo.

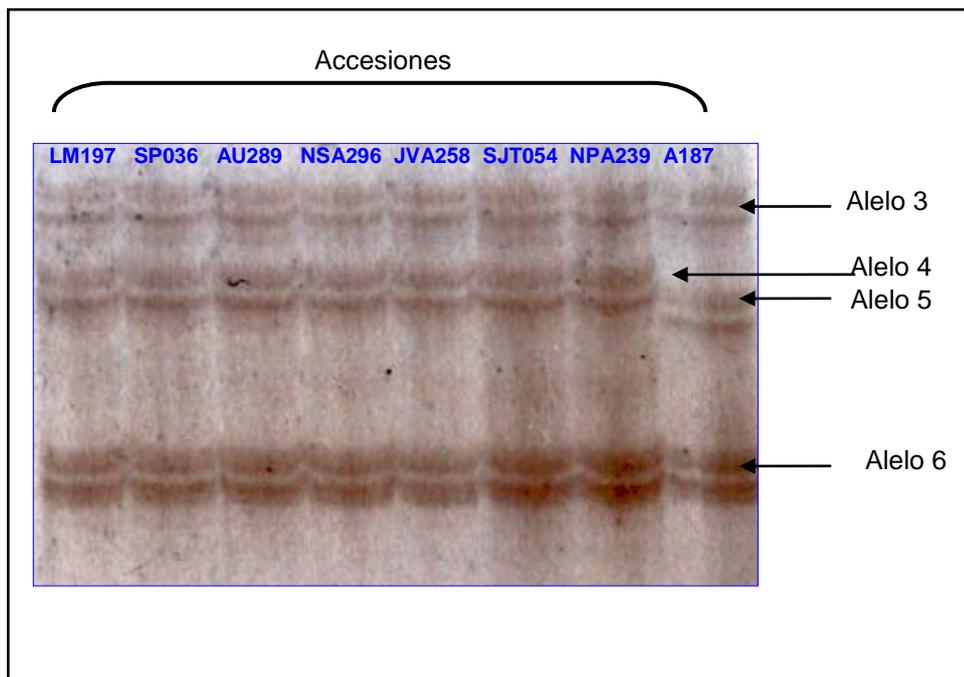


Figura 14. Accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106.

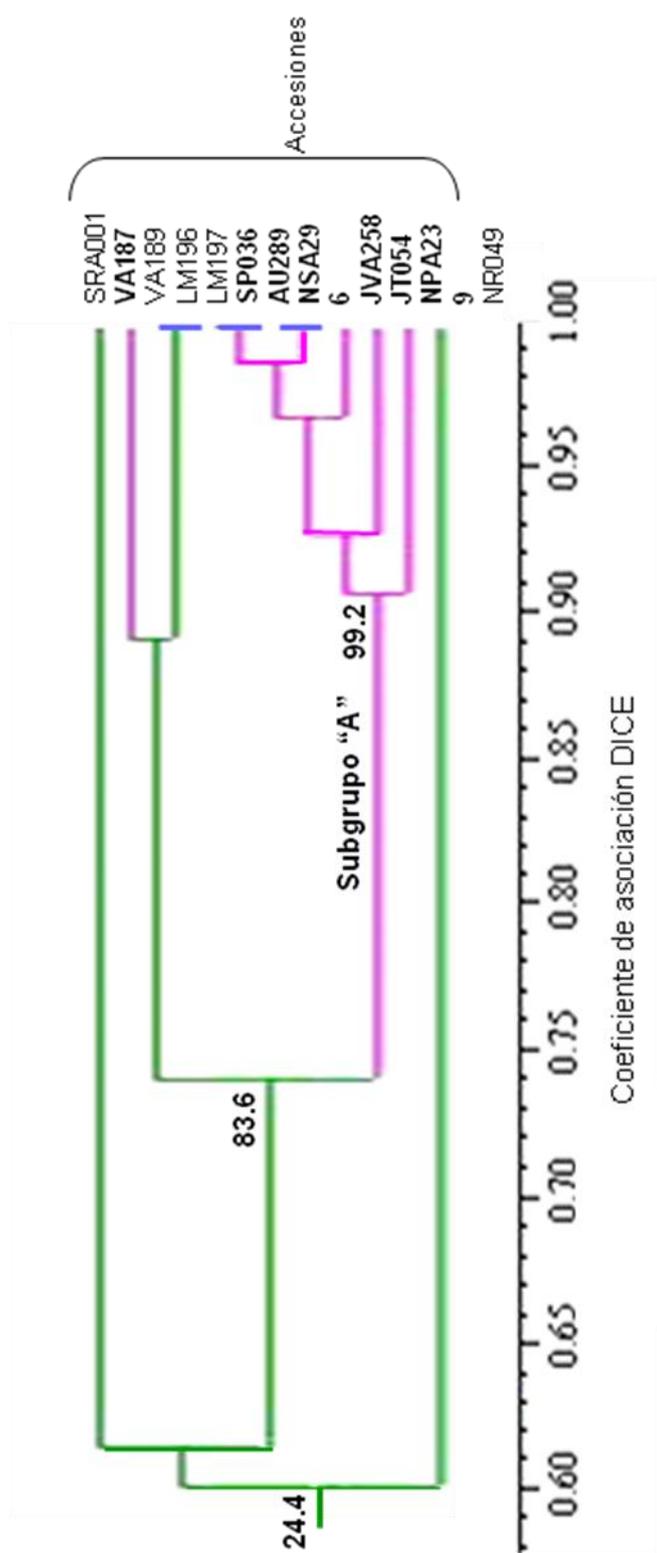


Figura 15. Grupo (1) y subgrupo("A") a los que pertenecen las accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSR Y106 y valores de porcentaje Bbootstrap (500 repeticiones).

3.1.4 Patrones genéticos

En el grupo de germoplasma analizado (100 accesiones) se halló un valor promedio de heterocigosidad total (Ht) de 0,67 (Tabla 14). En la tabla 12 se observa que la probabilidad promedio estimada de que dos alelos seleccionados al azar en una accesión dada sean diferentes en los sectores de colecta fue de 0,64, presentando el valor más alto el sector I (0,68) seguido del sector IV (0,66) y V (0,66) y el menor valor se halla en el sector VII (0,60).

El índice de fijación intrapoblacional promedio estimado en cada sector varía de 0,05 (sector III) a -0,12 (sector VI), el promedio es -0,0441 (Tabla 11), y la diferenciación genética o índice de fijación promedio entre los sectores es 0.0500 (Tabla 12). Estos valores son bajos, lo que indica una amplia distribución de alelos diferentes dentro y entre sectores, y esto se consolida con el registro de únicamente 6 alelos (4,51%) exclusivos para un solo sector y 9 alelos (6,77%) para una cuenca o carretera.

Tabla 11. Parámetros genéticos de diversidad, en 100 accesiones de *Manihot esculenta* colectadas en ocho sectores de la región Ucayali-Perú.

	Sector								Promedio
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
Hei	0,6773	0,6375	0,6231	0,6564	0,6605	0,6235	0,6024	0,6243	0,6381
Hot	0,6798	0,6054	0,6565	0,6321	0,6789	0,6957	0,7261	0,6453	0,6650
Fsi	-0,0038	0,0505	-0,0536	0,0371	-0,0279	-0,1156	-0,2054	-0,0336	-0,0441

Hei = Heterocigosidad esperada media total, Hot = heterocigosidad observada total. Fsi = índice de fijación intrapoblacional.

Tabla 12. Índices de fijación, en 100 accesiones de *Manihot esculenta* colectadas en ocho sectores de la región de Ucayali-Perú.

Fsi	Fst	Fit
-0,0421	0,0500	0,0100

Fsi = índice de fijación intrapoblacional, Fst índice de fijación entre poblaciones (sectores), Fit = índice de fijación para el conjunto de población (total).

La tabla 14 muestra que la cuenca del Aguaytía (34 accesiones) tiene la mayor diversidad genética seguida de la cuenca y carretera San Alejandro (13 accesiones cada una); por tanto, este resultado, sugiere una alta probabilidad de que dos alelos seleccionados al azar en una accesión de la cuenca o márgenes de la carretera San Alejandro son diferentes. Si se considera la semejanza de número de accesiones (Tabla 13), la cuenca del Aguaytía presenta mayor diversidad genética ($H_e = 0,67$) que la cuenca del Ucayali ($H_e = 0,64$), y la carretera San Alejandro ($H_e = 0,66$) y cuenca San Alejandro ($H_e = 0,66$) presentan valores similares de diversidad genética.

El índice de fijación intrapoblacional promedio (Tabla 15) es baja (0,0067), lo que sugiere una alta heterocigosidad en las accesiones dentro de cuencas.

Tabla 13. Valores de heterocigosidad esperada en 100 accesiones de *Manihot esculenta* colectadas en 3 cuencas y márgenes de 1 carretera de la región Ucayali-Perú.

	Cuenca / Carretera				Promedio
	Aguaytía	San Alejandro	Carretera San Alejandro	Ucayali	
Hei	0,6662	0,6564	0,6605	0,6423	0,6564

Hei = Heterocigosidad esperada promedio (diversidad genética)

Cuando se analizan las diferentes cuencas y márgenes de la carretera (Tabla 14), se observa que la proporción de variación promedio (diferencia genética promedio) entre sectores de las cuencas y márgenes de la carretera es mayor ($F_{sr} = 0,0278$) que la proporción promedio de variación entre cuencas o carretera ($F_{st} = 0,0228$); este resultado es debido a la diferencia del número de accesiones (Tabla 1) y sectores

dentro las cuencas o márgenes de la carretera (cuenca del Aguaytía = 3 sectores, cuenca de San Alejandro = 1 sector, carretera San Alejandro = 1 sector, cuenca del Ucayali = 3 sectores), por esta razón, más adelante se hace un análisis según semejanza en número de muestras.

Tabla 14. Parámetros genéticos de diversidad de 100 accesiones de *Manihot esculenta*, colectadas en tres cuencas y márgenes de una carretera, de la región Ucayali-Perú.

Hs	Hr	Ht	Gst	Fsr	Fst
0,6381	0,6564	0,6717	0,0500	0,0278	0,0228

Hs = heterocigosidad promedio de las subpoblaciones (sectores), Hr = heterocigosidad promedio regional (cuencas), Ht = heterocigosidad promedio total, Gst = diferenciación genética promedio entre subpoblaciones (entre sectores), Fsr = diferenciación entre sectores de las cuencas / carretera, Fst = diferenciación genética entre regiones (cuencas y carretera).

Tabla 15. Valores de heterocigosidad observada e índice de fijación intrapoblacional en 100 accesiones de *Manihot esculenta*, colectadas en tres cuencas y márgenes de una carretera de la región Ucayali-Perú.

	Cuenca / Carretera				Promedio
	Aguaytía	San Alejandro	Carretera San Alejandro	Ucayali	
Hot	0,6202	0,6321	0,6789	0,6793	0,6526
Fis	0,0733	0,0371	-0,0279	-0,0556	0,0067

Hei = Heterocigosidad esperada media total, Hot = heterocigosidad observada total.
Fsi = índice de fijación intrapoblacional.

Al comparar las cuencas del Aguaytía y Ucayali, tomando en cuenta que son: las áreas con mayor número de accesiones para el análisis (34 y 40 accesiones respectivamente) y las que poseen más sectores de colecta (3 en cada cuenca), hallamos que la diferencia de diversidad genética es la más elevada a lo encontrado en las demás comparaciones, siendo en promedio $F_{st} = 0,34$ (Tabla 16), lo cual

indicaría la existencia de un intercambio de germoplasma limitado entre estas dos áreas.

Por otra parte, la proporción promedio de varianza entre sectores de las cuencas, $F_{sr} = -0,4475$ (Tabla 16), indica un intercambio de germoplasma entre los sectores dentro de estas cuencas.

Tabla 16. Parámetros genéticos de diversidad de *Manihot esculenta* en las cuencas del Aguaytía y Ucayali de la región Ucayali.

Hs	Hr	Ht	Gst	Fsr	Fst
0,6314	0,4362	0,6623	0,0468	-0,4475	0,3415

Hs = heterocigosidad promedio de las subpoblaciones (sectores), Hr = heterocigosidad promedio regional (cuencas), Ht = heterocigosidad promedio total, Gst = diferenciación genética promedio entre subpoblaciones (entre sectores), Fsr = diferenciación entre sectores de las cuencas, Fst = diferenciación genética entre regiones (cuencas).

Al comparar accesiones colectadas en la cuenca de San Alejandro con las colectadas en los márgenes de la carretera San Alejandro (los que cuentan con un sector y trece accesiones cada uno), se obtiene que la diferencia genética es baja, $F_{st} = 0,0205$ (Tabla 18). Por tanto, es probable que haya intercambio de germoplasma.

Tabla 17. Parámetros genéticos de diversidad de *Manihot esculenta* la cuenca San Alejandro y márgenes de la carretera San Alejandro de la región Ucayali.

Hs	Ht	Gst	Fst
0,6585	0,6723	0,0205	0,0205

Hs = heterocigosidad promedio de las subpoblaciones (sectores), Ht = heterocigosidad promedio total, Gst = diferenciación genética promedio entre subpoblaciones (entre sectores), Fst = diferenciación genética entre regiones (cuencas).

Según la Tabla 18, tanto las comunidades de nativos y de colonos tienen una alta diversidad genética ($H_e = 0,66$ y $H_e = 0,68$, respectivamente) presentando la última mayor diversidad genética. La diferencia de diversidad genética entre ellas es baja

($F_{st} = 0,0038$), así como también el índice de fijación intrapoblacional ($F_{si} = 0,007$), observados en la Tabla 19. Estos valores indicarían una distribución homogénea de diversidad genética entre estas comunidades con un nivel de heterocigosidad alta.

Tabla 18. Valores de heterocigosidad esperada y observada e índice de fijación intrapoblacional en 100 accesiones *Manihot esculenta* colectadas en comunidades de nativos (CCNN) y de Colonos (CCCC) de la región Ucayali.

	Comunidad		Promedio
	CCNN	CCCC	
Hei	0,6629	0,6762	0,6696
Hot	0,6684	0,6613	0,6648
Fis	-0,0082	0,0220	0,0069

Hei = Heterocigosidad esperada media total (diversidad genética), Hot = heterocigosidad observada total. Fsi = índice de fijación intrapoblacional (dentro de las comunidades).

Tabla 19. Parámetros genéticos de diversidad de 100 accesiones de *Manihot esculenta* colectadas en comunidades de nativos (CCNN) y de colonos (CCCC) de la región Ucayali.

Fsi	Fst	Fit
0,0071	0,0038	0,0109

Fsi = índice de fijación intrapoblacional (dentro de comunidades), Fst índice de fijación entre poblaciones (entre comunidades).

Los resultados de la prueba estadística con el Test de Mann-Whitney (Anexo II) muestran una diferencia no significativa ($\alpha = 0,05$) entre los valores H de los sectores, cuenca y carretera; y comunidades, excepto entre los valores de diversidad genética de los sectores: I - VI; I - VII; IV - VII y V - VII (ver anexo II).

3.2 Distribución espacial

El programa DIVA-GIS permitió conocer gráficamente la distribución geográfica de las accesiones que presentan características interesantes según el análisis de agrupamiento; así también permitió observar la distribución de los alelos considerados como poco frecuentes.

Los alelos poco frecuentes por locus (frecuencia menor a 0,05), se hallan distribuidos en toda el área de colecta: sectores, cuencas y carretera (figura 15). Esto indicaría que existe alta diversidad en toda el área de estudio.

En la figura 16 se muestra la distribución espacial de los posibles duplicados, identificados en los resultados del análisis de agrupamiento o similitud genética (Tabla 10), donde cada uno de estos son representados con un color y una figura. En dicha figura se observa que el color y figura que representa a un posible duplicado no es común para todas las cuencas y carretera muestreadas, en cambio se encuentran en diferentes sectores en una misma cuenca. Así mismo se observa que la cuenca del Aguaytía (posibles duplicados 2 y 3) y Ucayali (posibles duplicados 1, 4, 8 y 10) no comparten ningún posible duplicado; por otra parte, la cuenca y carretera San Alejandro comparten el posible duplicado 6 (NH145 y AA060). Lo obtenido en este análisis está apoyando a los resultados del análisis de diferenciación genética, mostrando que la cuenca del Aguaytía y Ucayali conservan, cada una, un germoplasma genéticamente particular (Tabla 16), en contraste con la cuenca y márgenes de la carretera San Alejandro (Tabla 17).

La distribución, en la zona de estudio, de los 6 grupos formados por una sola accesión (Figura 13 = color rojo) se muestra en la figura 18, donde se revela claramente que la cuenca del Aguaytía posee todos estos, dándonos a pensar que esta cuenca es la que posee mayor diversidad que las otras cuencas y márgenes de la carretera.

Las accesiones en las que amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106 se encuentran distribuidas en las cuencas del Aguaytía y Ucayali (Figura 19).

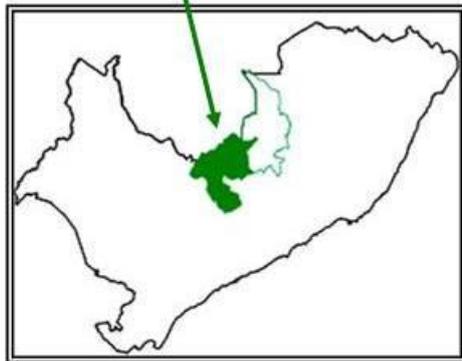
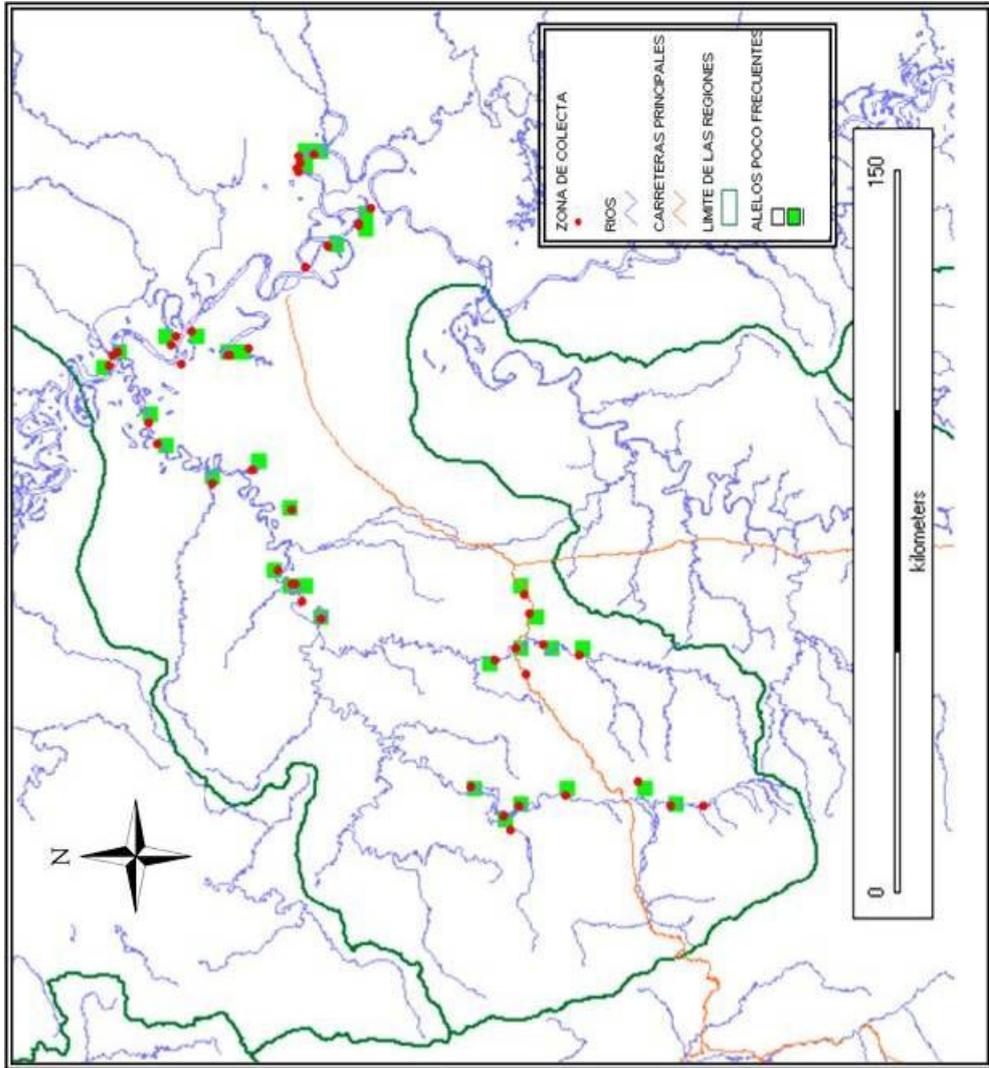


Figura 1 6. Distribución geográfica de los alelos con baja frecuencia por locus (menor o igual a 0.05)

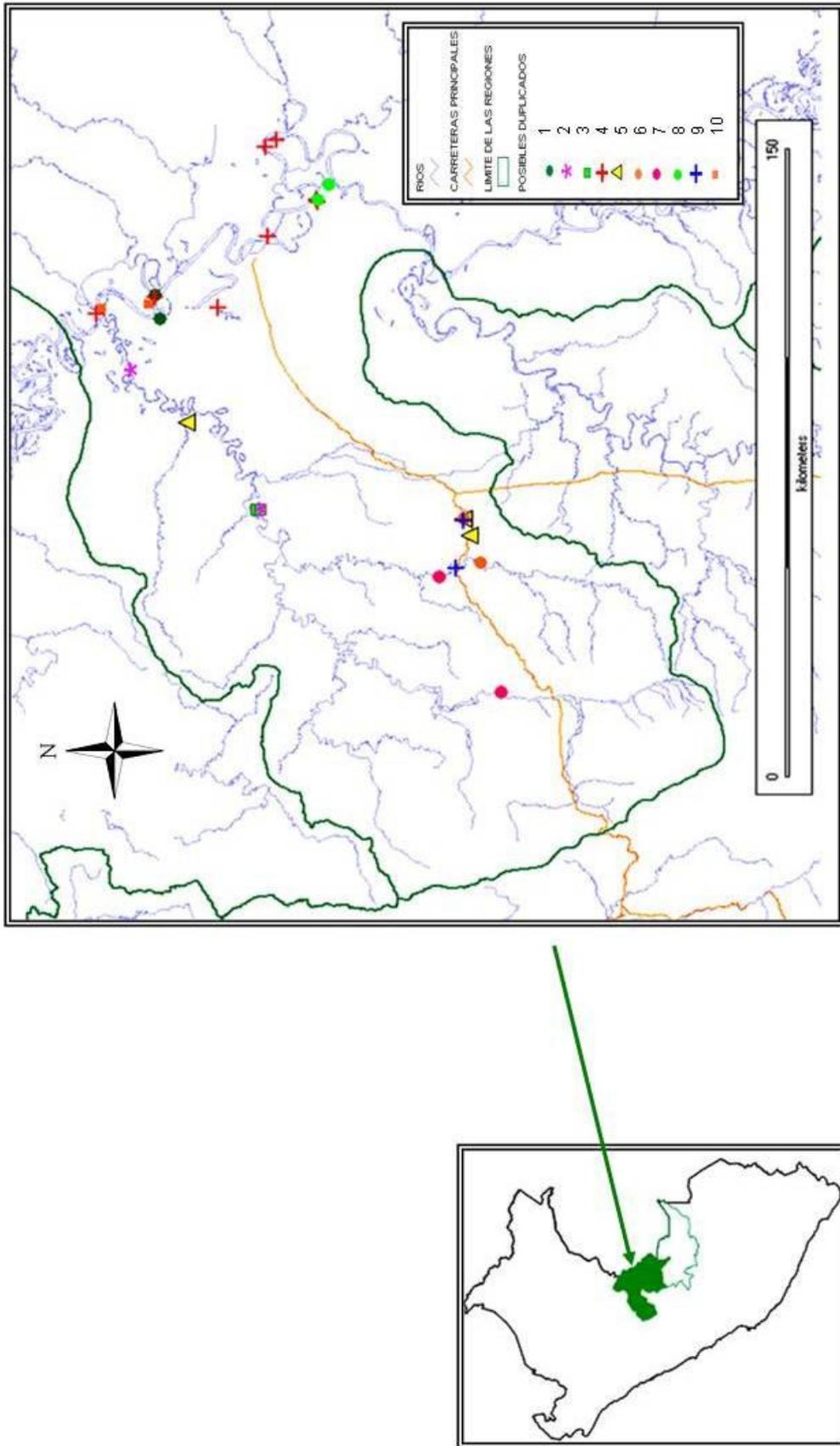


Figura 17. Distribución geográfica de los posibles duplicados, según el análisis de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud DICE de datos de marcadores moleculares microsatélites...

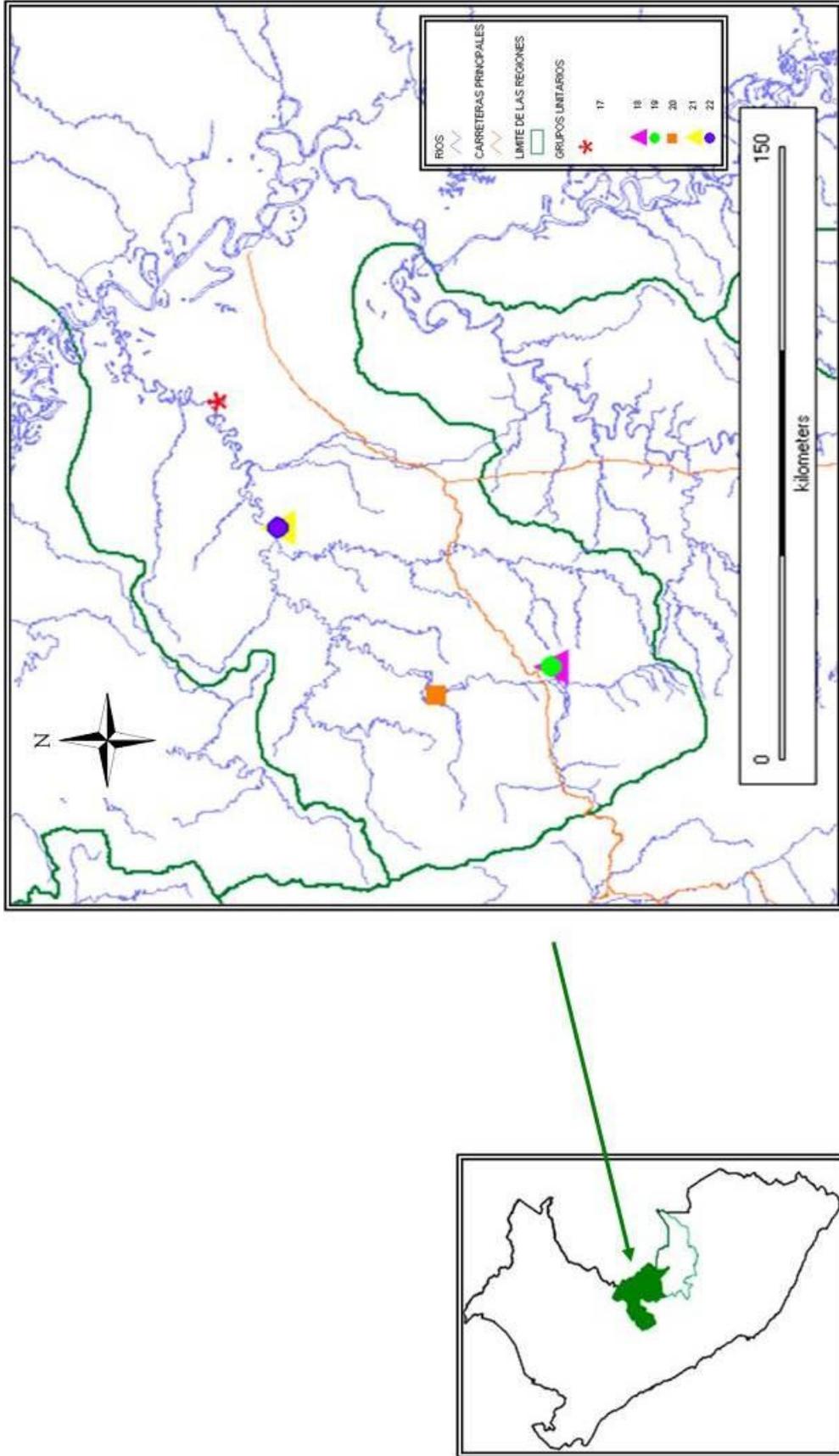


Figura 18. Distribución geográfica de los grupos unitarios (grupos formados por una sola entrada), según el análisis de agrupamiento UPGMA a partir de una matriz de similitud DICE de datos de marcadores moleculares microsatélites.

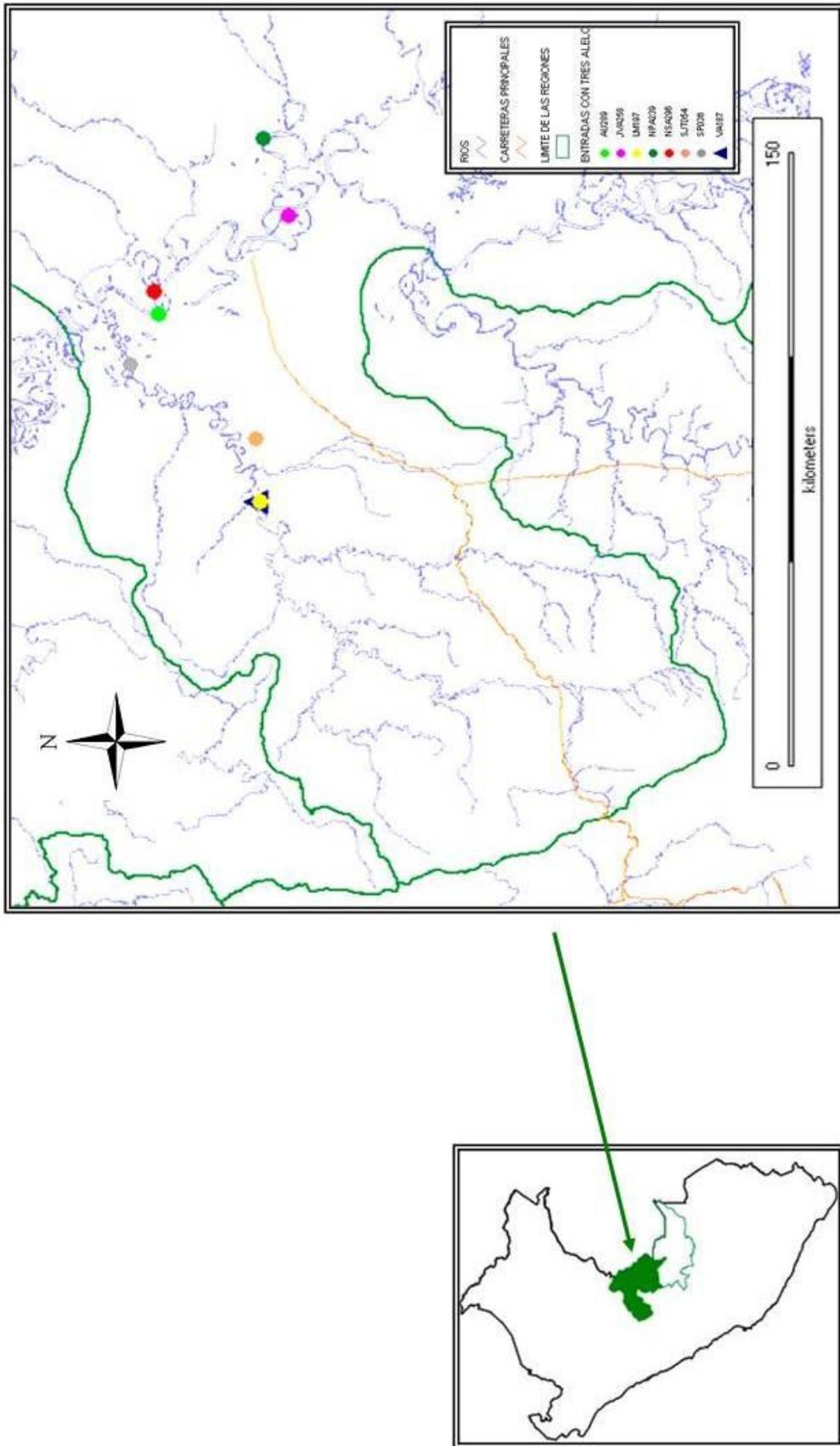


Figura 19. Distribución geográfica de las accesiones que amplificaron tres alelos con el iniciador SSR Y106.

Con el programa DIVA-GIS los resultados de los anteriores análisis son complementados con el análisis de la distribución geográfica de la riqueza de grupos, formados en el análisis de agrupamiento (figura 13 y tabla 9), y de la diversidad genética, usando datos moleculares y de pasaporte (Anexo I) para identificar las áreas con mayor diversidad. Siendo los valores representados por los colores de las grillas en forma descendente: rojo, naranja, amarillo, verde y celeste.

En la figura 20, observamos que el sector VIII es la zona de mayor riqueza de grupos (una grilla roja y una grilla naranja) seguido de los sectores IV y V (una grilla naranja y dos grillas verdes, para cada una), por otro lado, el sector VII es el de menor riqueza (una grilla celeste y dos grillas verdes).

En la figura 21 se identifica al sector I como el de mayor diversidad genética, por presentar más grillas rojas y naranjas (2 de cada una) que en el resto de sectores de colecta, en segundo lugar se presenta el sector IV con una grilla roja y dos naranjas, estos resultados se deben a la presencia valores de disimilitud mayores en estas áreas, indicando que allí se encuentran accesiones genéticamente distantes (pocos alelos compartidos y/o con un patrón de alelos poco comunes), contrario al sector VII en el que se ubican una grilla celeste y dos amarillas.

En el análisis de distribución de riqueza genética de las cuencas del Aguaytía y Ucayali (34 y 40 accesiones respectivamente), con el programa DIVA-GIS como herramienta, muestra que la primera tiene mayores valores de disimilitud (0,44 – 0,66) lo cual se identifica por la presencia de todas las grillas rojas (Figura 22), es decir que en la cuenca del Aguaytía se encuentra mayor diversidad genética que en la cuenca del Ucayali.

En cuanto a la cuenca y carretera San Alejandro, la cuadrícula roja está en la cuenca mas no en la carretera (Figura 23), por tanto la cuenca San Alejandro posee mayor diversidad genética.

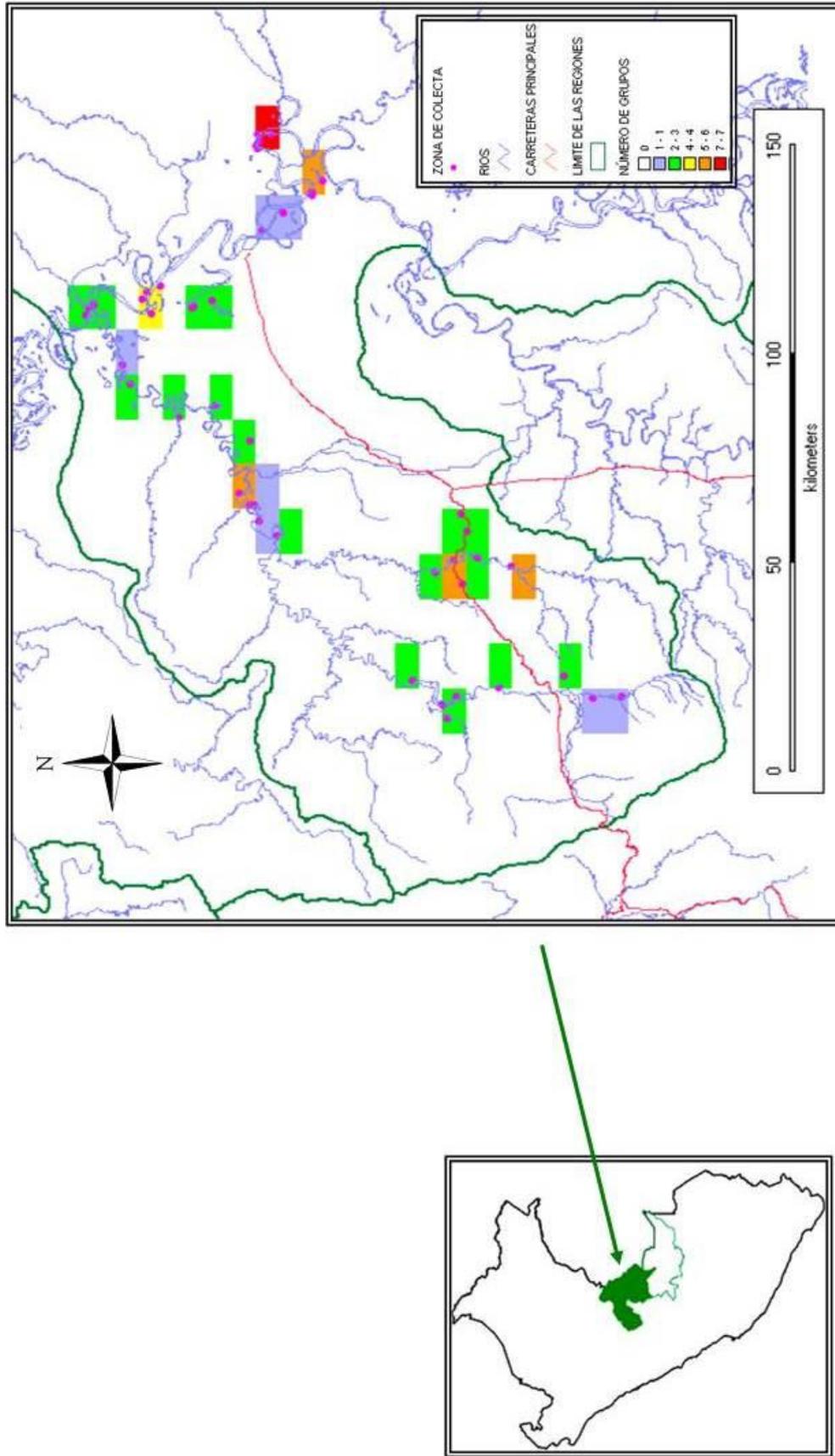


Figura 20. Distribución geográfica de las áreas con mayor riqueza de grupos (cuadrículas rojas y naranjas) formados en el análisis de agrupamiento UPGMA.

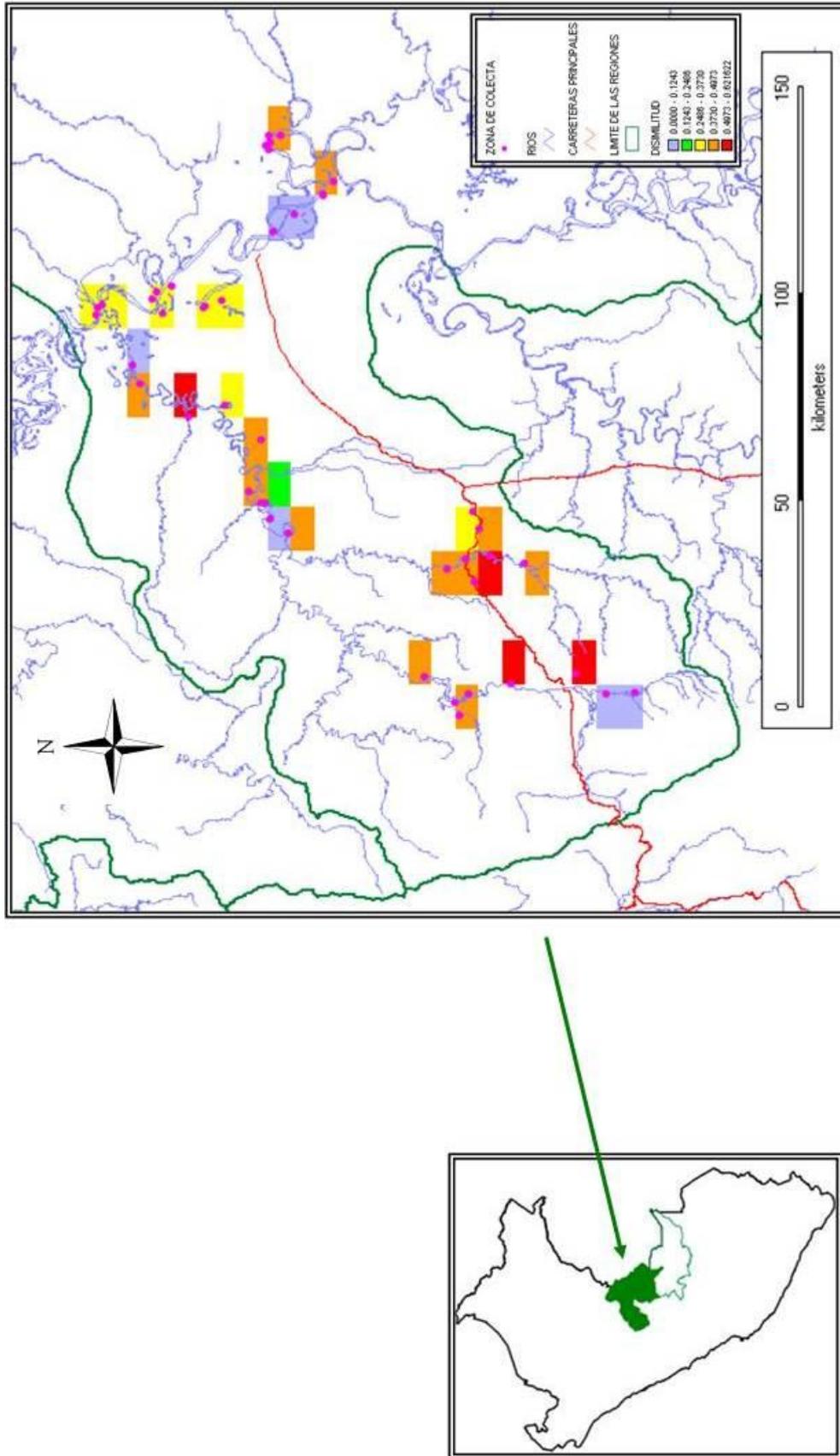


Figura 21. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética (cuadrículas rojas y naranjas), según el análisis de datos moleculares microsátélites con el programa DIVA-GIS.

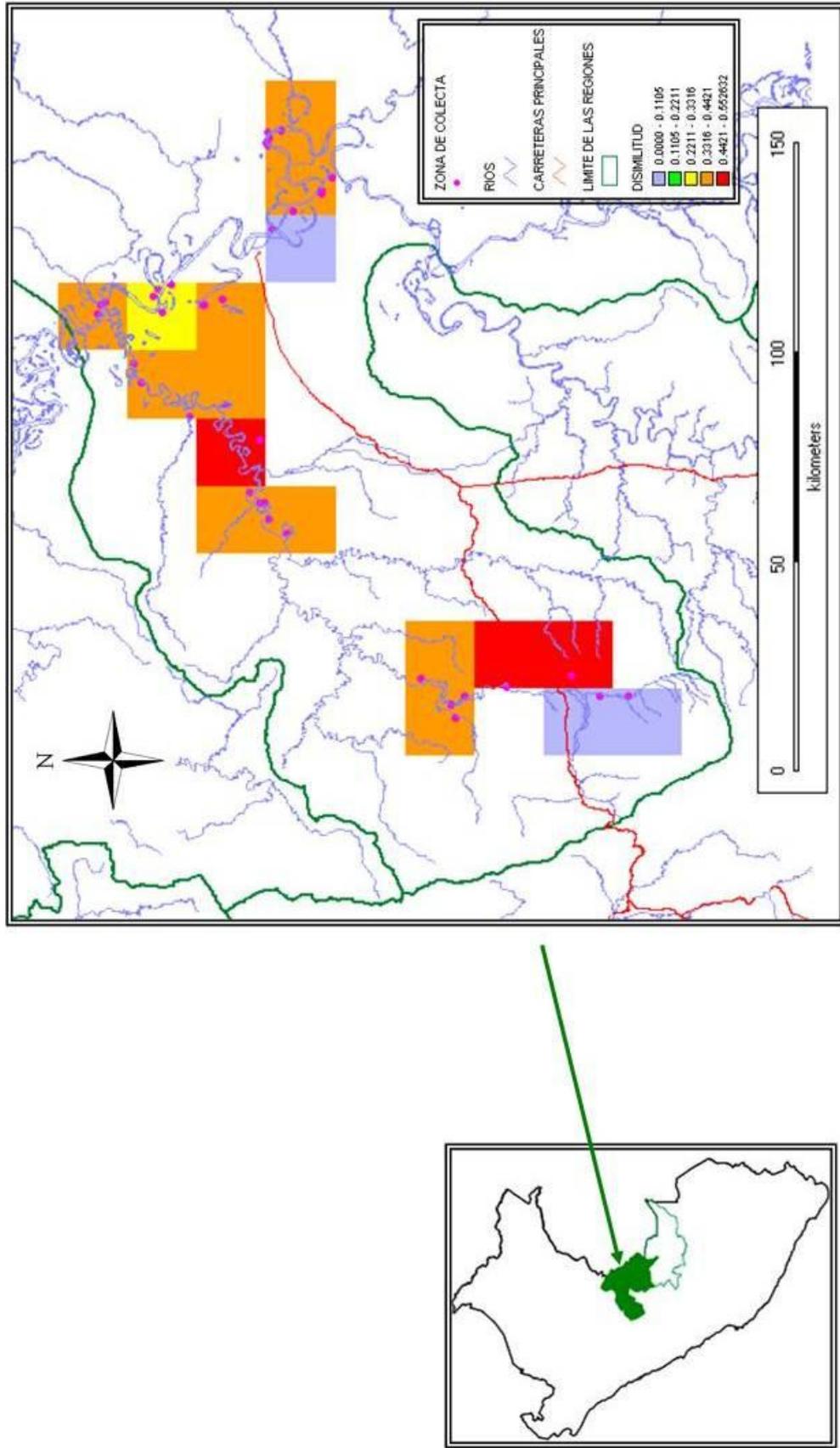


Figura 22. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética (cuadrículas rojas y naranjas) en las cuencas del Aguaytía y Ucayali, según el análisis de datos moleculares microsatélites con el programa DIVA-GIS.

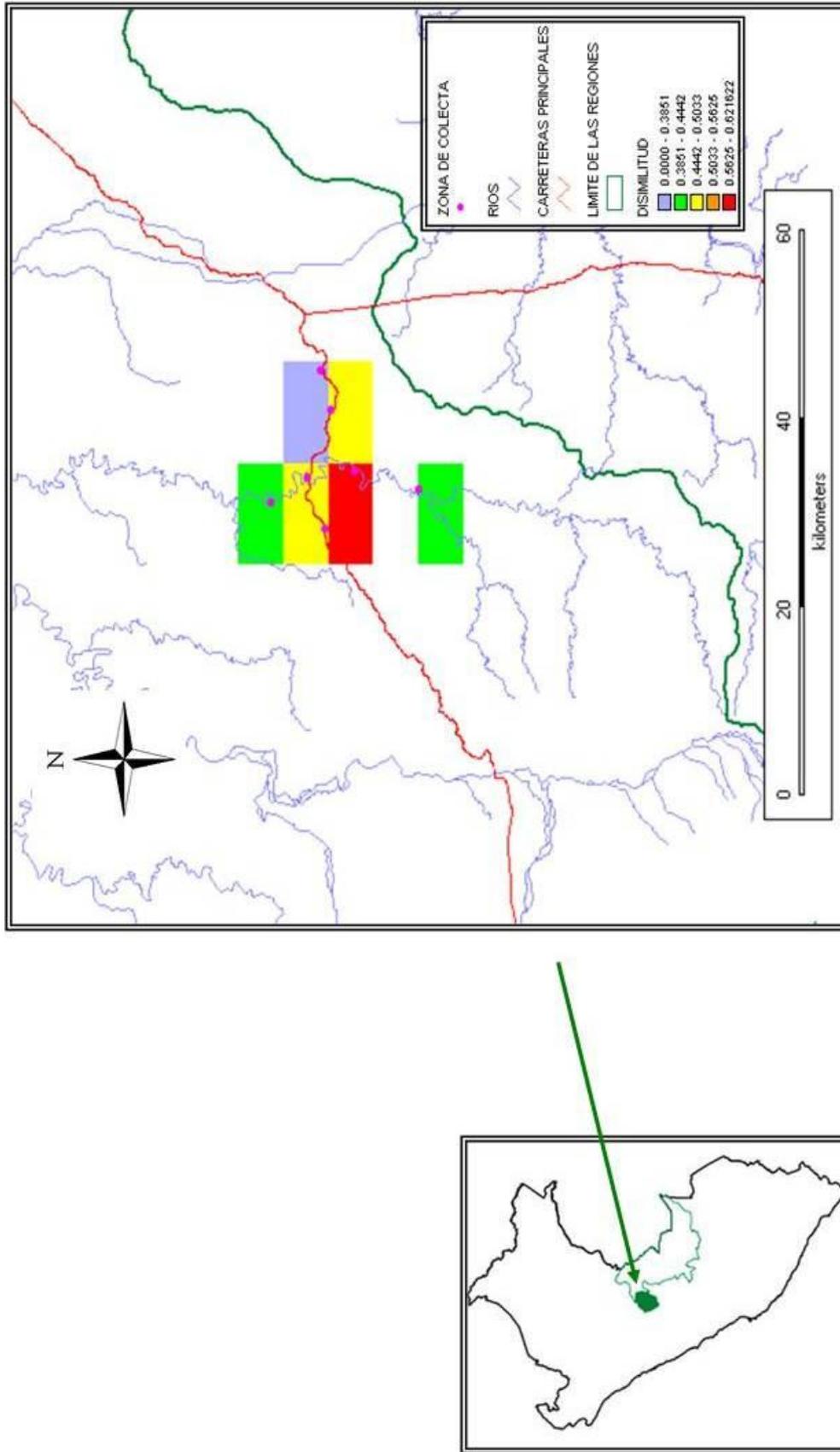


Figura 23. Distribución geográfica de las áreas de mayor diversidad genética (cuadrícula roja) en la cuenca y carretera San Alejandro, según el análisis de datos moleculares microsatélites con el programa DIVA-GIS.

CAPÍTULO IV

DISCUSIÓN

El poder discriminativo está determinado por el valor de contenido de índice polimórfico (PIC). El mayor poder discriminativo hallado en este trabajo lo presentaron los iniciadores SSRY19 y SSRY20 (PIC = 0,765 y 0,766, respectivamente) identificándose 7 alelos con cada uno, en contraste con los 9 alelos identificados con los iniciadores SSRY100 y SSRY4 (PIC = 0,746 y 0,745, respectivamente). Esto se debe a que el PIC estima el poder discriminativo del locus al tomar en cuenta no solo el número de alelos, sino también las frecuencias de los alelos (Andrade, 2001).

Con respecto a la riqueza de alelos, según la tabla del anexo IX, el número de alelos identificados por locus en otros estudios con marcadores SSR es casi concordante a lo hallado en el presente trabajo, a pesar de la diferencia en número de muestras tomadas para esos estudios. El 57 % de locos analizados tiene igual, mayor o una diferencia de un alelo del promedio de número de alelos hallado en otras investigaciones. Por tanto, las accesiones consideradas para este trabajo tendrían una muestra representativa de los alelos presentes en yucas de otros países.

La diversidad genética puede ser dada por la riqueza de alelos (FAO, 2003). La alta diversidad genética en el germoplasma estudiado también es demostrada por el valor promedio de alelos por locus (6 alelos), el cual es superior a lo hallado por Fregene y et al. (2003) en muestras de Perú (4 alelos por locus) y comparable o igual al número de alelos encontrado en accesiones de Colombia, país que tiene el mayor número de alelos (6 alelos). El resultado hallado en este trabajo no es contradictorio a lo encontrado por Fregene y et al. (2003), ya que se debe tener en cuenta que analizaron sólo 7 muestras de Perú, además Chavarriaga y et al. (1999) indican que Perú ocupa el tercer lugar de 23 países, después de Brasil y Colombia, en número de alelos diferentes (promedio de alelos por locus = 6,5) y alelos de baja frecuencia (7 alelos compartidos con menos de 5 países).

El análisis de distancias genéticas toma en cuenta la información que proporciona los marcadores SSR acerca de la relación entre las accesiones analizadas, basándose en el número de marcadores que comparten. En el dendograma generado (Figura 13) se identificaron 22 grupos formados por accesiones que no proceden del mismo lugar, lo

que indica una alta diversidad genética en el germoplasma analizado, ya que las accesiones colectadas en la misma área son distantes genéticamente.

El análisis de distancia genética también es utilizado para identificar posibles duplicados en el germoplasma conservado. En este estudio se halló 10 posibles duplicados, en el grupo 2 del dendograma se encontró 8 accesiones no diferenciadas y el 75 % (6 accesiones) tiene como nombre local “blanco”; esto demostraría una alta probabilidad de que se traten de duplicados todas aquellas accesiones no diferenciadas que tengan la misma denominación local.

Patrones genéticos calculados fueron la heterocigosidad y la diferenciación genética. La heterocigosidad esperada es referida como la diversidad genética y la diferenciación genética permite una comparación de niveles de heterocigosidad entre y dentro de las poblaciones. La yuca en la actualidad es propagada vegetativamente por los agricultores, pero es de naturaleza alógama, por ello no es sorprendente hallar alta diversidad en este cultivo (Dixon y et al., 2002 y Fregene y et al., 2003). En el grupo de germoplasma analizado (100 accesiones) se halló un valor promedio de heterocigosidad total (Ht) de 0,67. Este resultado indicaría una alta diversidad genética en la muestra al compararlo con la heterocigosidad total de 0,65 obtenido por Fregene y et al. (2003), en el estudio de diversidad genética de yuca de 9 países. Además, el mismo autor, muestra que Perú tiene el sexto lugar en heterocigosidad (0,60) de 14 grupos, los que estaban formados por muestras de 9 países, e incluso supera a varios grupos a pesar de haber sido representado por 7 accesiones en ese estudio.

Los resultados de la Tabla 13 muestran que la cuenca del Aguaytía ($H_e = 0,67$) es la más diversa genéticamente seguida de la cuenca y carretera San Alejandro ($H_e = 0,66$); por tanto, se sugiere que el bajo número de alelos (tabla 5) y grupos (Tabla 9) identificados en la cuenca y carretera San Alejandro es debido a la diferencia del número de muestras, lo cual va relacionado al número de alelos y este al número de grupos, mientras que los valores de heterocigosidad están afectadas por la frecuencia de los alelos en el grupo de muestras.

La diferencia de diversidad genética entre los grupos socioculturales es baja ($F_{st} = 0,0038$), así como también el índice de fijación intrapoblacional ($F_{si} = 0,007$); estos valores indicarían una distribución homogénea de diversidad genética entre estas

comunidades con un nivel de heterocigosidad alta, lo cual se explicaría por la constante comunicación entre estas comunidades.

La diferencia de diversidad genética entre las cuencas del Aguaytía y Ucayali (34 y 40 accesiones respectivamente), es la más elevada ($F_{st} = 0,34$), lo que indica la existencia de un intercambio de germoplasma limitado entre estas dos áreas, lo cual estaría apoyado por los resultados observados en el análisis de agrupamiento (Tabla 8 y figura 17) en el que se muestra que la cuenca del Aguaytía posee los 6 grupos unitarios (grupos formados por una accesión) y 2 grupos no compartidos con la cuenca del Ucayali y esta su vez tiene 3 grupos no comunes con Aguaytía y ningún grupo unitario, así también no comparten ningún posible duplicado (figura 17). Estos resultados se deberían a que la principal vía de acceso es la fluvial siendo más usada el río más cercano (ver figura 4), por lo que las comunidades intercambiarían con más frecuencia germoplasma entre las que tengan acceso al mismo río, lo cual estaría sustentado por la proporción de varianza baja ($F_{sr} = -0,45$) entre sectores dentro de las cuencas y la distribución espacial de los posibles duplicados (Figura 17). Entre la cuenca y carretera San Alejandro la diferencia genética es baja, $F_{st} = 0,0205$, indicando intercambio de germoplasma frecuente entre estas; probablemente debido a que se hallan poco distantes geográficamente y usan las dos vías de comunicación para sus actividades.

El análisis de distribución espacial usando el programa DIVA-GIS (figura 20) muestra al sector VIII como el más diverso, al igual que en el análisis de distancia genética, pero todos los otros métodos de análisis de diversidad utilizados, indican que los sectores I y IV son los más diversos genéticamente. Esto se debe a que el programa DIVA GIS representa la distribución geográfica de los grupos ya definidos por el método de agrupamiento e identifica las zonas de mayor riqueza según el número de grupos que haya dentro de una grilla (cuya área fue determinada de modo que no encierre a más de un sector). Por tanto, el resultado viene a ser la representación gráfica del análisis de agrupamiento en la zona de colecta. Y en el caso de análisis de distancia genética se explicaría por la influencia del número de muestras en el método (VIII = 19 muestras, otros sectores ≤ 13 muestras), ya que se asocia mayor número de muestras a mayor probabilidad de encontrar más alelos los que pueden no ser compartidos, desviando así el grado de similitud.

La posición del sector I en el último lugar (ninguna grilla roja ni naranja) en el análisis de riqueza de grupos (Figura 20) se debería a que los puntos de muestreo están distribuidos

distantes uno de otros, razón por lo que el programa DIVA-GIS no halló más de tres grupos dentro de una grilla, ya que cada una de estas fueron construidas para un área de 0,05 Km x 0,07 Km agrupando en su mayoría solo un punto de muestreo en el mencionado sector.

En el caso del análisis por grupo sociocultural, los resultados indican que las comunidades de colonos cuentan con mayor diversidad genética que las comunidades de nativos. En el caso del análisis de riqueza de alelos y de número de grupos se podría explicar por la diferencia del número de muestras (colonos = 57, nativos = 43), pero se esperaba que las muestra de las comunidades de nativos fuera la de mayor diversidad ya que se analizó el 35,8% de la colecta en estas y el 34,5% de la colecta de comunidades de colonos; y que la colecta fue realizada dando prioridad a las comunidades de nativos (todas las que se encuentran en la zona de estudio).

Las accesiones en las que se amplificaron tres alelos con el iniciador SSRY106 se encuentran distribuidas en las cuencas del Aguaytía y Ucayali (Figura 18), pero no se podría afirmar que sólo en estas zonas se encuentran accesiones con esta característica, debido a que los valores de heterocigosidad esperada y el análisis de distribución geográfica (figura 21) indican alta diversidad genética en la cuenca y carretera San Alejandro, por lo que se piensa que este resultado esta influenciado por el numero de muestras ya que sólo se contó con 13 individuos de cada una, mientras que de Las cuencas Aguaytía y Ucayali se analizaron 34 y 40 muestras, respectivamente.

Utilizando el iniciador SSRY47, no se obtuvo los marcadores microsatélites en 23 accesiones, posiblemente debido a mutaciones en la zona de acoplamiento del iniciador en el ADN de estas muestras dando lugar a un alelo no amplificado; este caso es explicado por Murray (1996) llamando a estos productos no amplificados “alelos nulos”.

CONCLUSIONES

El mayor poder discriminativo lo presentan los iniciadores SSRY19 y SSRY20, brindando mayor información genética en el germoplasma estudiado.

La mayor riqueza de alelos se encuentra en los sectores I y IV, con un promedio de 5 alelos por locus. Entre las cuencas y margen de carretera, Aguaytía presenta mayor número de alelos (121); y entre grupos socioculturales las accesiones provenientes de las comunidades de colonos presentan mayor riqueza de alelos (130).

El análisis de distancia genética muestra a los sectores VIII (9 grupos), I (8 grupos), y IV (8 grupos) como los de mayor diversidad genética. Entre las cuencas, Aguaytía posee mayor número de grupos (16) y entre los grupos socioculturales las accesiones provenientes de las comunidades de colonos se encuentran en mayor número de grupos (19).

Los resultados de los patrones genéticos revelan alta diversidad genética en el germoplasma analizado ($H_t = 0.67$), con accesiones altamente heterocigotas dentro de sectores de colecta, cuencas o márgenes de la carretera, y grupo sociocultural ($F_{si} = -0,044; 0,007$ y $0,007$ respectivamente). Presentan mayor diversidad genética el sector I ($H_{ei} = 0,68$), la cuenca de Aguaytía ($H_{ei} = 0,66$) y las comunidades de colonos ($H_{ei} = 0,68$). La diferenciación genética (F_{st}) entre sectores, cuencas y grupos socioculturales son bajas; pero entre accesiones de la cuenca de Aguaytía y Ucayali hay mayor diferenciación genética de $F_{st} = 0,34$.

El programa DIVA-GIS esclarece la distribución geográfica de las accesiones o alelos con particularidades de interés para el estudio de diversidad genética (alelos con baja frecuencia, accesiones posiblemente duplicadas, formados por una accesión y accesiones en las que amplificaron más de dos).

Los resultados del análisis de distribución espacial de la diversidad genética muestran esquemáticamente un panorama geográfico de la riqueza de la diversidad genética en el área de colecta similar o igual a lo encontrado con los demás análisis.

RECOMENDACIONES

El presente trabajo se realizó con 100 accesiones de *Manihot esculenta* de 295, colectadas en la región Ucayali de Perú, los resultados de diversidad genética de este cultivo, en la zona de estudio, serían más exactos al analizar las accesiones restantes, Por tanto, se recomienda hacer el análisis de diversidad genética tomando en cuenta los datos de las 295 accesiones.

Para el análisis de diversidad genética de yuca se recomienda utilizar un mayor número de iniciadores, como mínimo 30, según lo referido por Fregene y et al. (2003). En este trabajo se analizaron 23 locus, lo que implica completar el análisis con más iniciadores.

Se debe investigar las causas de que el iniciador SSRY47 no amplificó en 23 accesiones, sugiriéndose, un secuenciamiento de las zonas de complemento a la secuencia del iniciador, para descartar o confirmar la idea de que existe mutación en dicha área.

Con el presente estudio se detectaron 10 posibles duplicados, para confirmar esto, dichas accesiones deben ser sometidas a más análisis con otras técnicas moleculares así como AFLPs, además se deben complementar esos resultados con datos de caracterización morfológica.

Los 8 individuos que presentan 3 alelos con el iniciador SSRY106 y que coinciden en un mismo grupo, en el análisis de agrupamiento, deben ser sometidos a otros análisis de características agronómicas, morfológicas u otras para conocer si estas tienen otras particularidades de interés científico u otro.

Se debe investigar si los marcadores hallados están ligados a genes que se manifiestan como características agronómicas e industriales de interés, para contar con grupos de accesiones que pueden ser usados para mejoramiento genético.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, A. A. C. 2002. Cassava botany and physiology. *Cassava: biology, production and utilization*. Editorial AB Internacional. Bahia, Brasil. p. 67-88.
- ANAS y T. YOSHIDA. 2000. Analysis of Molecular Data. Faculty of Agriculture, Utsunomiya University.
- ANDRADE, D. 2001. Selección de la colección núcleo para *Solanum phureja* mediante el uso de marcadores microsatélites. Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Agraria la Molina. Perú. p. 109.
- BASSAM, B. J., G. CAETANO-ANOLLÉS y GRESSHOFF. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical Biochemistry*. Academia Press, Inc. USA. Vol. 196, p. 80-83.
- BECERRA, V. y M. PAREDES. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica*. Chile. Vol. 60 (3), p. 270-281.
- BRACK E.; A. 2003. Perú: diez mil años de domesticación. Editorial Bruño. Perú. p. 160.
- BRECHING, J., F. MARMEY, M. GAVALDA, M. NOIROTH. HAYSOM, M. HUGHES Y A. CHARRIER. 1993. An assessment of genetic diversity within a collection of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm using molecular markers. *Annals of Botany*. Vol. 72: 515-520.
- CASSERES, E. H. 1986. Papa, yuca y camote, cultivo y aprovechamiento. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. FAO. Santiago.
- CENIS, J. L. 2000. "Nuevas técnicas moleculares para la identificación varietal de plantas". *Terralia. Cida: La Alberca*. Vol. 12, p. 40 -43.

- CHAVARRIAGA A, P., M. M. MAYA; J TOHME. M. C. DUQUE; C. IGLESIAS, M. W. BONIERBALE, S. KRESOVICH y G. KOCHERT. 1999. Using microsatellites, isozymes and AFLPs to evaluate genetic diversity and redundancy in the cassava core collection and to assess the usefulness of DNA-based markers to maintain germplasm collections. *Molecular Breeding*. Kluwer Academic Publishers. Nedtherlands. Vol. 5 p. 263–273.
- DE CARVALHO, R y M GUERRA. 2002. Cytogenetics of *Manihot esculenta* Crantz (cassava) and eight related species. *Hereditas*. Brasil. Vol. 136 p. 159-168.
- DIXON A., A. RAJI, J. MARIN y M. FREGENE. 2002. Simple sequence repeat (SSR) marker diversity in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) landraces from Nigeria. *Improving cassava for the Developing World: Annual report*. p. 13-19.
- DUKE, J. A. 1983. "*Manihot esculenta* Crantz". *Handbook of Energy Crops*. Unpublished.
- DUKE, M. C. 2001. Métodos estadísticos aplicados en biología molecular. CIAT. Colombia.
- EKE-OKORO, O.; A. DIXON, A. RAJI, J. MARIN, M. FREGENE y C. BUITRAGO, 2002. Genetic Diversity of Cassava Landraces from Nigeria As Assessed By Simple Sequence Repeat (SSR) Markers. Centro Internacional de Agricultura Tropical (www.ciat.cgiar.org/molcas/estudios.jsp?code=2&pais=Nigeria).
- EMPERAIRE, L., F PINTON y G SECOND. 2001. Dinámica y manejo de la diversidad de las variedades de yuca del noroccidente amazónico (Brasil). *Etnoecológica*. Vol. 5. (7). p. 38-59.
- FAO. 2003. Glossary on forest genetic resources. Editorial IUFRO. Rome, Italy. p. 89.
- FAO-FRG. 2002. *Manihot esculenta* Crantz (M. utilísima Pohl). www.fao.org
- FERNÁNDEZ F., M. I., R. MEIRELES D. S., A. ANDO y P. SODERO M. 2000. Varabilidad genética de etnovariedades de mandioca em regiões geográficas do Brasil. *Scientia Agrícola*. Brasil. Vol. 57 (3), p 499-505.

- FERREIRA, M. E. y D. GRATTAPAGLIA. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. EMBRAPA-CENARGEN. Brasilia, DF. p. 221
- FLORES MERCEDES Y GRACIELA VILCAPOMA. 2003. Botánica Sistemática: Guía de Prácticas. Perú. p. 33.
- FONDEVILA, A. y A. MOYA. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Editorial Síntesis. España. p. 349.
- FREGENE, M.; F. ANGEL; R. GÓMEZ; F. RODRÍGUEZ; P. CHAVARRIAGA; W. ROCA; J. TOHME Y M BONIERBALE. 1997. A molecular genetic map of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Theor Appl Genet*. Springer – Verlag. USA. Vol. 95 p 431–441.
- FREGENE, M. A.; M SUÁREZ; J MKUMBIRA, H. KULEMBEKA, E. NDEDYA, A. KULAYA, S. MITCHEL, U. GULLBERG, H. ROSLING, A. G. O. DIXON y R DEAN. 2003. Simple sequence repeat marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in asexually propagated crop. *Theor Appl Genet*. Springer – Verlag. USA. Vol. 107 p 1083–1093.
- GHISLAIN, M., D. ZHANG, y M. R. HERRERA. 1997. Molecular biology laboratory protocols plant genotyping. Genetic resources Department Training Manual. International Potato Center. Lima, Perú. p. 30.
- GOLDSTEIN, D. B. y SCHIÖTTERER. 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press. New York, United States. p. 352.
- GUARINO, L., RAMANATHA RAO, V., 1995. Collecting plant genetic diversity: technical guidelines. Editorial CAB International. Roma-Italy. p. 748.
- HERNÁNDEZ, H. M., A. N. GARCÍA A., F. ÁLVAREZ y M. ULLOA. 2001. Enfoques contemporáneos para el estudio de la biodiversidad. Ediciones Científicas Universitarias-Texto Científico Universitario. México. p. 413.
- HIJMANS, R., L. GUARINO, C. BUSSINK, I. BARRANTES, E. ROJAS. 2002. Sistema de información geográfica para el análisis de datos de biodiversidad: manual. Internacional Potato Center. Lima, Perú. p. 67.

- IPGRI. 2001. "DIVA Nueva herramienta de información geográfica aplicable al manejo de los recursos fitogenéticos". *Boletín de las Américas*. Colombia. Vol. 7, (1).4.
- LEFÉVRE, F. y A. CHARRIER. 1993. Isozyme diversity within African Manihot germplasm. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers. USA. Vol. 66 (1-2): 73 - 80.
- MARMEY, P., J. R BEECHING, S. HAMON y A. CHARRIER. 1994. Evaluation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm collections using RAPd markers. *Euphytica*. Kluwer Academic Publishers. USA. Vol. 74: 203-209.
- MARTINEZ M., A., J. L. VEGA P. 2002. Estudios de variación genética utilizando microsatélites de ADN. Unidad de Veterinaria, Departamento de Genética, Universidad de Córdoba y Laboratorio de Genética Molecular- Servicio de Cría Caballar. Córdoba-España. p. 10.
- MURRAY B. W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. Department of Biology, McMaster University. Canada. (<http://www.helix.biology.mcmaster.ca/brent/node15.html>)
- NASSAR N. 2001. Cassava, *Manihot esculenta* Crantz and wild relatives: Their relationships and evolution. *Genetic Resources and Crop Evolution*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands. Vol. 48, p 429–436.
- NUEZ, F y J. M. CARRILLO. 2000. Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Sociedad Española de Genética. S. E. de Ciencias Hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia. España. Ed. U.P.U. p. 579.
- O'HAIR, S. K. 1995. Cassava. Tropical research y Education Center. University of Florida. USA.
- OLSEN, K. M. y B. A SCHAAL. 2001. Microsatellite variation in cassava (*Manihot esculenta*, Euphorbiaceae) and its wild relatives: further evidence for a southern Amazonian origin of domestication. *American Journal of Botany*. USA. Vol. 88 (1): 131 – 142.

- RESENDE G., A.; P. VIDIGAL y MACHADO M. F. 2004. Esterase polymorphism parking cultivars of *Manihot esculenta*, Crantz. *Brazilian Archives of Biology technology*. Brasil. Vol 47 (3): 377-353.
- ROHLF, F. 1993. NTSYS pc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software. New York. EE. UU.
- SAMBROOK, J., E. FRITSCH, T. MANIATIS. 1989. Molecular cloning: A laboratory manual. Vol. 1. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- STEPHENSON, P., K. EDWARDS, S. MELZER, J. NKUMBIRA, U. GULLBERG, K APEL, M. GALE, J. TOHME y M. FREGENE. 2001. Simple sequence repeat (SSR) markers survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genome: towards an SSR-based molecular genetic map of cassava. *Theor Appl Genet*. Springer-Verlag. USA. Vol. 102, p. 21-31.
- TAPIA E, M.1996. Ecodesarrollo en los andes altos. Fundación Friedrich Eber. Perú. P. 196.
- TAPIA, M., TORRES, J. 2002. Parientes Silvestres de los cultivos nativos en el Perú. Proyecto Conservación *In Situ* de los Cultivos Nativos y sus Parientes Silvestres. Lima-Perú. p. 70.
- ZAMORANO, M. J. 1998. Utilización de medidas genéticas coadyuvantes a los planes de mejora del vacuno de carne. Tesis doctoral. Universidad de Córdoba. España. p. 191.
- ZUCCHI M. I. 2002. Análise da estrutura genética de *Eugenia dysenterica* DC utilizando marcadores RAPD e SSR. Tesis de Doctorado, Escuela Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de Sao Paulo. Brasil. p 148.

ANEXO I

Datos de pasaporte de las 100 accesiones analizadas

Código/colecta.	País	Región	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha colecta	Genero	Especie	Nom. local	Germoplasma	Latitud	Longitud	Altitud
SRA001	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	SANTA ROSA DE AGUAYTÍA	08/05/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.73981	-75.47767	288
SRA002	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	SANTA ROSA DE AGUAYTÍA	08/05/01	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.73981	-75.47767	288
PA005	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	PUERTO AZUL	09/05/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 9.19566	-75.51948	303
C010	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	CEDRUYO	10/05/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 9.06383	-75.47069	287
MC020	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	MARISCAL CÁCERES	01/05/01	Manihot	esculenta	BOA	CULTIVADO	- 8.80475	-75.53564	263
MN021	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	MEBANAÑU	27/04/01	Manihot	esculenta	8 MESINOS	CULTIVADO	- 8.92400	-75.49556	241
MN023	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	MEBANAÑU	27/04/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.92400	-75.49556	241
B169	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	BELLAVISTA	14/10/01	Manihot	esculenta	UMSHINA	CULTIVADO	- 8.83436	-75.51639	246
NEY175	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	NUEVA ESPERANZA DE YAMINO	17/10/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.81569	-75.56361	264
NCH177	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	NUEVA CHONTA	22/10/01	Manihot	esculenta	HUALLAGINA	CULTIVADO	- 9.12744	-75.51728	313
C182	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	PADRE ABAD	CEDRUYO	23/10/01	Manihot	esculenta	UCHICINA 8M	CULTIVADO	- 9.06383	-75.47069	287
CN026	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	CAMBIO NOVENTA	22/05/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.41167	-75.12253	164
VA028	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	22/05/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174
VA029	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	22/05/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174
VA031	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	22/05/01	Manihot	esculenta	ARPON RUMO	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174
SJTA032	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	SAN JUAN DE TAHUAPOA	20/05/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.36628	-75.06158	175
DM183	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	DOS DE MAYO	26/10/01	Manihot	esculenta	PUCALLPINA	CULTIVADO	- 8.45042	-75.15531	178
DM185	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	DOS DE MAYO	26/10/01	Manihot	esculenta	UMSHIMA RUMO	CULTIVADO	- 8.45042	-75.15531	178
VA187	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	15/11/01	Manihot	esculenta	HUANGANA	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174
VA188	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	15/11/01	Manihot	esculenta	MARIA RUMO	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174
VA189	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	15/11/01	Manihot	esculenta	MARIA	CULTIVADO	- 8.39200	-75.08653	174

Código/colecta	País	Dpto.	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha-colecta	Genero	Especie	Nom.-local	Germoplasma	Latitud	Longitud	Altura
VA193	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	VISTA ALEGRE	15/11/01	Manihot	esculenta	UMSHIMA	CULTIVADO	8.39200	-75.08653	174
LM196	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	LAS MALVINAS	16/11/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	8.40064	-75.08689	157
LM197	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	CURIMANA	LAS MALVINAS	16/11/01	Manihot	esculenta	SEÑORITA	CULTIVADO	8.40064	-75.08689	157
SP036	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	SHAMBO EL PORVENIR	18/07/01	Manihot	esculenta	PAN	CULTIVADO	8.11631	-74.77583	150
E037	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	ESPERANZA	21/07/01	Manihot	esculenta	DIMA	CULTIVADO	8.13194	-74.81861	158
E039	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	ESPERANZA	21/07/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	8.13194	-74.81861	158
SPJ045	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	SAN PABLO DE JUANTIA	19/07/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	8.23800	-74.89339	147
SPJ047	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	SAN PABLO DE JUANTIA	19/07/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	8.23800	-74.89339	147
NR049	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	NUEVA REQUENA	21/07/01	Manihot	esculenta	SEÑORITA	CULTIVADO	8.31550	-74.86656	156
NR050	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	NUEVA REQUENA	21/07/01	Manihot	esculenta	ROJITA	CULTIVADO	8.31550	-74.86656	156
NR052	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	NUEVA REQUENA	NUEVA REQUENA	21/07/01	Manihot	esculenta	ENANA	CULTIVADO	8.31550	-74.86656	156
SJT054	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CAMPO VERDE	SAN JOSÉ DE TUNUYA	20/07/01	Manihot	esculenta	PALO BLANCO	CULTIVADO	8.39114	-74.94425	163
SJT058	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CAMPO VERDE	SAN JOSÉ DE TUNUYA	20/07/01	Manihot	esculenta	ARPON MORADO	CULTIVADO	8.39114	-74.94425	163
NU260	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVO UCAYALI	30/05/02	Manihot	esculenta	SEÑORITA	CULTIVADO	8.41778	-74.47543	150
SS262	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SAN SALVADOR	17/06//02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	8.30847	-74.63267	153
SS264	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SAN SALVADOR	17/06//02	Manihot	esculenta	SHANTONA AMARILLO	CULTIVADO	8.30847	-74.63267	153
SS265	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SAN SALVADOR	17/06//02	Manihot	esculenta	SHANTONA BLANCO	CULTIVADO	8.30847	-74.63267	153
SCLA267	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SANTA CLARA	18/06/02	Manihot	esculenta	PANSHIN	CULTIVADO	8.26733	-74.64658	174
SCLA269	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SANTA CLARA	18/06/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	8.26733	-74.64658	174
SCLA273	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	SANTA CLARA	18/06/02	Manihot	esculenta	TRES MESINOS	CULTIVADO	8.26733	-74.64658	174
NE275	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	NUEVO EGIPTO	19/06/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	8.27156	-74.64525	158
NE276	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	NUEVO EGIPTO	19/06/02	Manihot	esculenta	PANSHIN	CULTIVADO	8.27156	-74.64525	158
NE278	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	NUEVO EGIPTO	19/06/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	8.27156	-74.64525	158
SR109	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	SHIRIA	CULTIVADO	8.95183	-75.22408	258
SR113	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	8.95183	-75.22408	258

Código/colecta	País	Dpto.	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha-Colecta.	Género	Especie	Nom.-local	Germoplasma	Latitud	Longitud	Altura
SR116	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	SEÑORITA 3 MESINAS	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
SR118	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	ASA RITAÑOSA	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
SR120	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	ENANA	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
SR130	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	URRUA	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
SR136	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	CHALLQUI	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
SR138	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SINCHI ROCA	14/09/01	Manihot	esculenta	NEGRA	CULTIVADO	- 8.95183	-75.22408	258
NH145	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO HUANUCO	17/09/01	Manihot	esculenta	CHAUCHE	CULTIVADO	- 8.88019	-75.20583	203
NH148	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO HUANUCO	17/09/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.88019	-75.20583	203
NT153	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO TAHUANTINSUYO	20/09/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.78875	-75.23681	192
NT155	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO TAHUANTINSUYO	20/09/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.78875	-75.23681	192
NT156	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO TAHUANTINSUYO	20/09/01	Manihot	esculenta	NEGRA	CULTIVADO	- 8.78875	-75.23681	192
PC281	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	PUERTO CARIDAD	26/10/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.03958	-74.66586	156
T282	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	TAJSHITEA	22/10/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.04425	-74.64728	146
T283	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	TAJSHITEA	22/10/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.04425	-74.64728	146
P285	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	PANAILLO	24/10/02	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.05364	-74.64028	142
P286	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	PANAILLO	24/10/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.05364	-74.64028	142
P287	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	YARINACOCHA	PANAILLO	24/10/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.05364	-74.64028	142
AU289	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	ALFONSO UGARTE	28/10/02	Manihot	esculenta	ROJO	CULTIVADO	- 8.18008	-74.66219	149
SAV293	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	SAN ANTONIO VIEJO	25/10/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.15847	-74.62775	176
NSA296	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVO SAN ANTONIO	23/10/02	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.16936	-74.61106	156
NSA298	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVO SAN ANTONIO	23/10/02	Manihot	esculenta	BLANCO 6 MESES	CULTIVADO	- 8.16936	-74.61106	156
NP299	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVO PARIS	26/10/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.19986	-74.60050	178
NBRR214	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA BARRANCA	20/04/02	Manihot	esculenta	RUMO	CULTIVADO	- 8.52353	-74.39217	152
NBRR215	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA BARRANCA	20/04/02	Manihot	esculenta	MARIA RUMO	CULTIVADO	- 8.52353	-74.39217	152
NBRR218	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA BARRANCA	20/04/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.52353	-74.39217	152

Código/colecta	País	Dpto.	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha-Colecta.	Género	Especie	Nom.-local	Germoplasma	Latitud	Longitud	Altura
L219	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	ARPON	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
L221	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	CHINCAN	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
L223	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
L225	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
L227	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
SIB229	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	SANTA ISABEL DE BAHUANISHO	22/04/02	Manihot	esculenta	BLANCA 6 MESINAS	CULTIVADO	- 8.54769	-74.36342	152
NB234	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA BETANIA	26/04/02	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.40219	-74.28486	152
VIE237	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	VILLA ESTHER	25/04/02	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.41056	-74.27525	152
NPA239	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA PALESTINA	26/04/02	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.40756	-74.26172	152
NPA241	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA PALESTINA	26/04/02	Manihot	esculenta	ENANA	CULTIVADO	- 8.40756	-74.26172	152
NPA243	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA PALESTINA	26/04/02	Manihot	esculenta	JUSHIN	CULTIVADO	- 8.40756	-74.26172	152
PB245	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	PUERTO BETEL	28/04/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	- 8.43469	-74.25925	154
AC247	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	ALVA CASTRO	27/04/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	- 8.44295	-74.31419	138
L250	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	LIMONGEMA	18/04/02	Manihot	esculenta	JUSHO	CULTIVADO	- 8.52386	-74.39714	155
NAL252	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	NUEVA ALIANZA	24/05/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.40643	-74.29149	16
JVA258	Perú	Ucayali	CORONEL PORTILLO	CALLERIA	JUAN VELASCO	28/05/02	Manihot	esculenta	AMARILLO	CULTIVADO	- 8.46236	-74.43722	158
AA059	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	ASCENCIÓN DE AGUAYTILLO	23/08/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.84389	-75.10750	266
AA060	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	ASCENCIÓN DE AGUAYTILLO	23/08/01	Manihot	esculenta	BLANCO	CULTIVADO	- 8.84389	-75.10750	266
AA061	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	ASCENCIÓN DE AGUAYTILLO	23/08/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.84389	-75.10750	266
AA063	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	ASCENCIÓN DE AGUAYTILLO	23/08/01	Manihot	esculenta	SHILPE	CULTIVADO	- 8.84389	-75.10750	266
AA071	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	ASCENCIÓN DE AGUAYTILLO	23/08/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.84389	-75.10750	266
NHR072	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO HORIZONTE	22/08/01	Manihot	esculenta	BLANCA	CULTIVADO	- 8.85514	-75.14575	355
NHR073	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVO HORIZONTE	22/08/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.85514	-75.14575	355
SAL076	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SAN ALEJANDRO	24/08/01	Manihot	esculenta	SEÑORITA	CULTIVADO	- 8.82797	-75.21294	214
SAL083	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SAN ALEJANDRO	24/08/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.82797	-75.21294	214

Código/colecta	País	Dpto.	Provincia	Distrito	Localidad	Fecha-Colecta.	Género	Especie	Nom.-local	Germoplasma	Latitud	Longitud	Altura
SAL085	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SAN ALEJANDRO	24/08/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.82797	-75.21294	214
SAL093	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SAN ALEJANDRO	24/08/01	Manihot	esculenta	AMARILLA	CULTIVADO	- 8.82797	-75.21294	214
SAL097	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	SAN ALEJANDRO	24/08/01	Manihot	esculenta	MORADO	CULTIVADO	- 8.82797	-75.21294	214
NA106	Perú	Ucayali	PADRE ABAD	IRAZOLA	NUEVA AMÉRICA	23/08/01	Manihot	esculenta	CHILPE	CULTIVADO	- 8.84781	-75.26347	275

ANEXO II

Pruebas de significancia estadística: Mann-Whitney

Resultados de la prueba de de significancia estadística de las diferencias entre los valores de heterocigosidad, en cada nivel (de cada una de las zonas de Colecta).

Mann-Whitney Test and CI: I; II

I N = 23 Median = 0,6925
II N = 23 Median = 0,6593
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0384
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0054; 0,0992)
W = 618,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0907
The test is significant at 0,0907 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: I; III

I N = 23 Median = 0,6925
III N = 23 Median = 0,6641
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0294
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0221; 0,0906)
W = 592,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,2579
The test is significant at 0,2578 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: I; IV

I N = 23 Median = 0,6925
IV N = 23 Median = 0,6777
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0143
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0379; 0,0644)
W = 570,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,5241
The test is significant at 0,5240 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: I; V

I N = 23 Median = 0,6925
V N = 23 Median = 0,6712
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0234
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0228; 0,0752)
W = 583,5

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,3505
The test is significant at 0,3504 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: I; VI

I N = 23 Median = 0,6925
VI N = 23 Median = 0,6405
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0541
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (0,0101; 0,1065)
W = 642,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0258
The test is significant at 0,0257 (adjusted for ties)

Mann-Whitney Test and CI: I; VII

I N = 23 Median = 0,6925
VII N = 23 Median = 0,5864
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0915
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (0,0340; 0,1433)
W = 669,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0048
The test is significant at 0,0048 (adjusted for ties)

Mann-Whitney Test and CI: I; VIII

I N = 23 Median = 0,6925
VIII N = 23 Median = 0,6624
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0420
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0017; 0,0926)
W = 628,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0560
The test is significant at 0,0560 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; III

II N = 23 Median = 0,6593
III N = 23 Median = 0,6641
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0046
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0660; 0,0560)
W = 530,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,8261
The test is significant at 0,8261 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; IV

II N = 23 Median = 0,6593
IV N = 23 Median = 0,6777
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0227

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0852; 0,0335)
W = 502,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4100
The test is significant at 0,4100 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; V

II N = 23 Median = 0,6593
V N = 23 Median = 0,6712
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0212
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0896; 0,0370)
W = 513,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,5531
The test is significant at 0,5530 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; VI

II N = 23 Median = 0,6593
VI N = 23 Median = 0,6405
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0178
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0437; 0,0678)
W = 574,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4618
The test is significant at 0,4617 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; VII

II N = 23 Median = 0,6593
VII N = 23 Median = 0,5864
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0453
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0229; 0,1028)
W = 596,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,2227
The test is significant at 0,2227 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: II; VIII

II N = 23 Median = 0,6593
VIII N = 23 Median = 0,6624
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0055
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0576; 0,0606)
W = 549,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,8605
The test is significant at 0,8605 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: III; IV

III N = 23 Median = 0,6641
IV N = 23 Median = 0,6777
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0150
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0837; 0,0415)
W = 508,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4820
The test is significant at 0,4820 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: III; V

III N = 23 Median = 0,6641
V N = 23 Median = 0,6712
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0059
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0740; 0,0500)
W = 531,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,8433
The test is significant at 0,8432 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: III; VI

III N = 23 Median = 0,6641
VI N = 23 Median = 0,6405
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0231
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0427; 0,0816)
W = 582,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,3677
The test is significant at 0,3677 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: III; VII

III N = 23 Median = 0,6641
VII N = 23 Median = 0,5864
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0537
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0254; 0,1200)
W = 603,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,1697
The test is significant at 0,1697 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: III; VIII

III N = 23 Median = 0,6641
VIII N = 23 Median = 0,6624
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0122
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0506; 0,0713)

W = 556,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,7417

The test is significant at 0,7417 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: IV; V

IV N = 23 Median = 0,6777

V N = 23 Median = 0,6712

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0083

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0469; 0,0643)

W = 554,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,7752

The test is significant at 0,7751 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: IV; VI

IV N = 23 Median = 0,6777

VI N = 23 Median = 0,6405

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0390

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0166; 0,0988)

W = 610,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,1296

The test is significant at 0,1295 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: IV; VII

IV N = 23 Median = 0,6777

VII N = 23 Median = 0,5864

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0727

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (0,0006; 0,1336)

W = 633,5

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0421

The test is significant at 0,0421 (adjusted for ties)

Mann-Whitney Test and CI: IV; VIII

IV N = 23 Median = 0,6777

VIII N = 23 Median = 0,6624

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0311

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0241; 0,0887)

W = 587,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,3122

The test is significant at 0,3122 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: V; VI

V N = 23 Median = 0,6712
VI N = 23 Median = 0,6405
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0324
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0195; 0,0902)
W = 592,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,2625
The test is significant at 0,2625 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: V; VII

V N = 23 Median = 0,6712
VII N = 23 Median = 0,5864
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0608
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (0,0040; 0,1219)
W = 637,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,0340
The test is significant at 0,0340 (adjusted for ties)

Mann-Whitney Test and CI: V; VIII

V N = 23 Median = 0,6712
VIII N = 23 Median = 0,6624
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0192
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0324; 0,0898)
W = 573,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4820
The test is significant at 0,4820 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: VI; VIII

VI N = 23 Median = 0,6405
VIII N = 23 Median = 0,6624
Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0123
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0625; 0,0423)
W = 520,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,6604
The test is significant at 0,6604 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: VI; VII

VI N = 23 Median = 0,6405
VII N = 23 Median = 0,5864
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0324
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0313; 0,0895)
W = 589,5
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,2866

The test is significant at 0,2866 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: VII; VIII

VII N = 23 Median = 0,5864

VIII N = 23 Median = 0,6624

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,0430

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0973; 0,0303)

W = 478,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,1732

The test is significant at 0,1731 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: nativos; Colonos

Nativos N = 23 Median = 0,68594

Colonos N = 23 Median = 0,68772

Point estimate for ETA1-ETA2 is -0,01459

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,05881;0,02773)

W = 506,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4551

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: AGUAYTÍA; SAN ALEJANDRO

Aguaytía N = 23 Median = 0,7034

SANALEJA N = 23 Median = 0,6777

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0055

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0465;0,0656)

W = 552,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,8090

The test is significant at 0,8090 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: AGUAYTÍA; CARRSANALEJ

AGUAYTIA N = 23 Median = 0,7034

CARRSANA N = 23 Median = 0,6712

Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0211

95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0420;0,0711)

W = 568,0

Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,5531

The test is significant at 0,5530 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: AGUAYTÍA; UCAYALI

AGUAYTIA N = 23 Median = 0,7034

UCAYALI N = 23 Median = 0,6657
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0330
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0195; 0,0778)
W = 597,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,2186
The test is significant at 0,2186 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: SAN ALEJANDRO; CARRSANALEJ

SANALEJA N = 23 Median = 0,6777
CARRSANA N = 23 Median = 0,6712
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0083
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0469;0,0643)
W = 554,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,7752
The test is significant at 0,7751 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: SAN ALEJANDRO; UCAYALI

SANALEJA N = 23 Median = 0,6777
UCAYALI N = 23 Median = 0,6657
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0197
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0332;0,0808)
W = 578,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,4163
The test is significant at 0,4163 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

Mann-Whitney Test and CI: CARRSANALEJ; UCAYALI

CARRSANA N = 23 Median = 0,6712
UCAYALI N = 23 Median = 0,6657
Point estimate for ETA1-ETA2 is 0,0134
95,2 Percent CI for ETA1-ETA2 is (-0,0414; 0,0721)
W = 560,0
Test of ETA1 = ETA2 vs ETA1 not = ETA2 is significant at 0,6764
The test is significant at 0,6763 (adjusted for ties)

Cannot reject at alpha = 0,05

ANEXO III

Soluciones para la extracción de ADN

Tampón de extracción CTAB 2X

Stock	Final	100 ml
CTAB	2%	2,00 g
NaCl	1,4 M	8,12 g
EDTA 0,5M; pH 8.0	20,0 mM	4,00 ml
Tris HCl 1M; pH 8.0	100,0 mM	10,00 ml
PVP	1,0%	1,00 g
H ₂ O destilada		completar a 100,00 ml

Tampón de extracción CTAB 10X

Stock	Final	100 ml
CTAB	10,0%	10,00 g
NaCl	0.7 M	4,09 g
EDTA 0.5M, pH 8,0	20,0 mM	4,00 ml
Tris-HCl 1M, pH 8.0	100,0 mM	10,00 ml
H ₂ O destilada		completar a 100,0 ml

Tampón T₁₀E₁

Stock	Final	100 ml
Tris HCl 1M, pH 8.0	10,0 mM	1,0 ml
EDTA 0.5M, pH 8.0	1,0 mM	200,0 µL
H ₂ O destilada		completar a 100,0 ml

ARNasa 10 mg/ml

Stock	Final	5 ml
ARNasa	10,0 mg/ml	50,0 mg
Tris HCl 1M, pH 7,5	10,0 mM	50,0 µl
NaCl 5M	15,0 mM	15,0 µl
H ₂ O destilada		completar a 5 ml

ANEXO IV

Electroforesis en geles de agarosa

Preparación de geles de agarosa al 1%

Stock	Final	100 ml
Agarosa	1,0%	1,0 g
TBE 1X	1,0 X	100,0 ml
EtBr 10 mg/ml	2,5%	2,5 μ L

Tampón de carga para geles de agarosa (SALB 10X)

Stock	Final	50 ml
Azul de bromofenol	0,15%	75,0 mg
Xilen cianol	0,15%	75,0 mg
Naranja G	0,20%	100,0 mg
Sucrosa	60,00%	30,0 g
TBE 10X	0,5 X	2,5 ml
H ₂ O destilada MilliQ		completar a 50 ml

ANEXO V

Soluciones para electroforesis en geles de Poliacrilamida

Solución stock de acrilamida 40%

Stock	Final	1000 ml
Acrilamida	6,0%	380,0 g
Bisacrilamida	0,3%	20,0 g
H ₂ O ultra pura (milli Q)		completar a 1000,0 ml

Solución de acrilamida 6%, urea 7 M

Stock	Final	1000 ml
Acrilamida 40%	6,0%	150,0 ml
Urea	7,0 M	420,0 g
TBE 10X	1,0 X	100,0 ml
H ₂ O destilada		completar a 1000,0 ml

Solución nitrato de plata

Stock	Final	1000 ml
Nitrato de Plata	0,10%	1,0 g
Formaldehido (37%)	0,55%	1 500,0 µl
H ₂ O ultra pura (milli Q)		1 000 ml

Solución Carbonato de Sodio

Stock	Final	750 ml aprox.
Carbonato de Sodio	3,0%	22,5 g
Formaldehido (37%)	0,06%	1125,0 µL
Tiosulfato de Sodio 10%	0,00024%	15,0 µL
H ₂ O destilada		750,0 ml

Tampón de carga para geles de poliacrilamida

Stock	Final	10 ml
Dye	1,0 %	100,0 µL
EDTA 0.5M	2,0 %	200,0 µL
Formamida	97,0 %	9,7 ml

Dye

Stock	Final	1 ml
Xilen cianol	5,0 %	50,0 mg
Azul de bromuro fenol	5,0 %	50,0 mg
H ₂ O destilada		1,0 ml

Peso molecular de los colorantes en geles de poliacrilamida

Colorante	Acrilamida al 6%	Acrilamida al 10%
Xilen cianol	110,0 pb	55,0 pb
Azul de bromuro fenol	25,0 pb	10,0 pb

Tomado de Sambrook 1989

ANEXO VI**Tampón TBE****Tampón TBE 10X**

Stock	Final	1000 ml
Trizma base	90,0 mM	107,0 g
Ácido bórico	5,5 %	55,0 g
EDTA 0.5M, pH 8.0	22,0 mM	8,2 g
H ₂ O destilada MilliQ		completar a 1000,0 ml

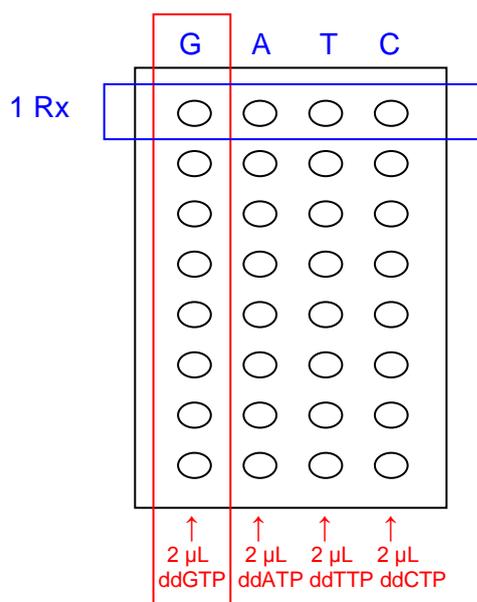
ANEXO VII

Marcadores de peso molecular

Reacción de secuenciamiento

Master mix	1 Rx
H ₂ O libre de nucleasas	1,4 µL
pUC 18	7,0 µL
Buffer 5x	5,0 µL
Iniciador	3,6 µL
Taq polimerasa	1,0 µL

Preparación de placa de la reacción de secuenciamiento



- Colocar 2 µL de ddNTPs a cada hoyo de la columna correspondiente.
- Añadir 4 µL de master mix a cada hoyo cambiando el tip para no contaminarlo.
- Finalmente agregar el aceite mineral con mucho cuidado

Programa PCR de secuenciamiento del plásmido pUC 18

Ciclo	Temperatura (°C)	Tiempo (min.)
1 ciclo	95	2,0
50 ciclos	95	0,5
	42	0,5
	70	1,0
Final	4,0	hasta detener PCR

Detener la PCR con la solución “stop solution” del Kit.

DNA Sequencing System pUC 18

1. Sequence and Restriction Enzyme Cleavage Sites for pUC18

TCGCGCGTTT	CGGTGATGAC	GGTGAAAACC	TCTGACACAT	GCAGCTCCCG	GAGACGGTCA	60
CAGCTTGTCT	GTAAGCGGAT	GCCGGGAGCA	GACAAGCCCG	TCAGGGCGCG	TCAGCGGGTG	120
TTGGCGGGTG	TCGGGGCTGG	CTTAACTATG	CGGCATCAGA	GCAGATTGTA	CTGAGAGTGC	180
ACCATATGCG	GTGTGAAATA	CCGCACAGAT	GCGTAAGGAG	AAAATACCGC	ATCAGGCGCC	240
ATTCGCCATT	CAGGCTGCGC	AACTGTTGGG	AAGGGCGATC	GGTGCGGGCC	TCTTCGCTAT	300
TACGCCAGCT	GGCGAAAGGG	GGATGTGCTG	CAAGGCGATT	AAGTTGGGTA	ACGCCAGGCT	360
TTTTCCCACTC	ACGAC GTTGT	AAAACGACGG	CCAGTGCCAA	GCTTGCATGC	CTGCAGGTTCG	420
	29	39	49	59	69	
ACTCTAGAGG	ATCCCCGGGT	ACCGAGCTCG	AATTCGTAAT	CATGGTCATA	GCTGTTTCCT	480
79	89	99	109	119	129	
GTGTGAAATT	GTTATCCGCT	CACAATTCCA	CACAACATAC	GAGCCGGAAG	CATAAAGTGT	540
139	149	159	169	179	189	
AAAGCCTGGG	GTGCCTAATG	AGTGAGCTAA	CTCACATTAA	TTGCGTTGCG	CTCACTGCCC	600
199	209	219	229	239	249	
GCTTTCAGT	CGGGAAACCT	GTCGTGCCAG	CTGCATTAAT	GAATCGGCCA	ACGCGCGGGG	660
259	269	279	289	299	309	
AGAGGCGGTT	TGCGTATTGG	GCGCTCTTCC	GCTTCCTCGC	TCACTGACTC	GCTGCGCTCG	720
319	329	339	349	359	369	
GTCGTTCCGC	TGCGGCGAGC	GGTATCAGCT	CACTCAAAGG	CGGTAATACG	GTTATCCACA	780
					429	
GAATCAGGGG	ATAACGCAGG	AAAGAACATG	TGAGCAAAG	GCCAGCAAAA	GGCCAGGAAC	840
					489	
CGTAAAAGG	CCGCGTTGCT	GGCGTTTTTC	CATAGGCTCC	GCCCCCTGA	CGAGCATCAC	900
AAAAATCGAC	GCTCAAGTCA	GAGGTGGCGA	AACCCGACAG	GACTATAAAG	ATACCAGGCG	960
TTTCCCCTG	GAAGCTCCCT	CGTGCGCTCT	CCTGTTCCGA	CCCTGCCGCT	TACCGGATAC	1020
CTGTCCGCCT	TTCTCCCTTC	GGGAAGCGTG	GCGCTTTCTC	ATAGCTCAGC	CTGTAGGTAT	1080
CTCAGTTCGG	TGTAGGTCGT	TCGCTCCAAG	CTGGGCTGTG	TGCACGAACC	CCCCGTTTCCAG	1140
CCCGACCGCT	GCGCCTTATC	CGGTAACTAT	CGTCTTGAGT	CCAACCCGGT	AAGACACGAC	1200
TTATCGCCAC	TGGCAGCAGC	CACTGGTAAC	AGGATTAGCA	GAGCGAGGTA	TGTAGGCGGT	1260
GCTACAGAGT	TCTTGAAGTG	GTGGCCTAAC	TACGGCTACA	CTAGAAGGAC	AGTATTTGGT	1320

ANEXO VIII

Tamaño en pares de bases de los alelos identificados por cada iniciador en 100 entradas de *Manihot esculenta*, según el sistema de secuenciamiento de ADN del plásmido pUC18.

Alelo	Iniciador											
	SSRY4	SSRY9	SSRY12	SSRY19	SSRY20	SSRY21	SSRY51	SSRY52	SSRY61	SSRY64	SSRY69	SSRY82
1	308	284	277	225	160	198	303	270	236	301	253	213
2	292	271	274	223	155	187	288	268	227	298	246	203
3	288	266	271	220	153	165	284	266	224	193	238	200
4	285	263	268	214	152		280	259		191	236	197
5	283	254	263	204	148		262	252		183	229	186
6	278		257	198	143			248			222	
7	275		251	185	126						218	
8	274										213	
9	263											

Alelo	Iniciador											
	SSRY100	SSRY101	SSRY106	SSRY135	SSRY161	SSRY164	SSRY177	SSRY179	SSRY180	SSRY181	SSRY182	
1	242	241	281	260	227	188	274	188	182	199	240	
2	221	227	277	254	225	186	270	182	173	194	235	
3	217	224	275	151	219	176	263	179	165	191	231	
4	215	221	268	242	182	169	259	175	161	189	228	
5	213	213	264			159	245	173		187	223	
6	209	209	252				239	171				
7	203						233	168				
8	199							166				
9	192											

Codificación de los alelos:

EJEMPLO: 179-5-5 = SSRY179 - alelo 5 del locus - alelo 5 en la población

ANEXO IX

Número de alelos identificados de *Manihot esculenta* en trabajos de diferentes países con marcadores SSR (www.ciat.cgiar.org/molcas, 2002)

Locus	País								Promedio	Perú (100 accesiones)
	*Perú (100)	Nigeria (283)	Tanzania (293)	Guatemala (142)	Ghana (249)	Uganda (317)	Cuba (287)	Sierra Leone (94)		
SSRY100		5	16	10	17	7	10	4	9.9	9
SSRY101	5		10						7.5	6
SSRY106	5	4	12	5	7	5	6	6	6.3	6
SSRY12		4	8	6	8	6	6	6	6.3	7
SSRY135		4	10	5		3	5	4	5.2	4
SSRY161		5	15	7		7	7	6	7.8	4
SSRY164		5	17	7	16	8	8	6	9.6	5
SSRY177	8	6	11			6	8	6	7.5	7
SSRY179		6		4	14	7	4	6	6.8	8
SSRY180	6	4	8	7		7	6	4	6.0	4
SSRY181			9	5	5	4	4	6	5.5	5
SSRY182		5	7			9			7.0	5
SSRY19	6	6	15	7	14	12	11	6	9.6	7
SSRY20		7	15	13	7	10	7	9	9.7	7
SSRY21	5	5	11	5	8	7	8	4	6.6	3
SSRY4		6		6	5	6	8	5	6.0	9
SSRY51	6	3	14	7	11	6	9	9	8.1	5
SSRY52		4	8		6				6.0	6
SSRY61		3	5						4.0	3
SSRY64	7	4	9	4	11	7	9	5	7.0	5
SSRY69	5	5	14	8	8	8	9	6	7.9	8
SSRY9	4		8	4	8	5	6	4	5.6	5
SSRY82		5	9	8		9	5	5	6.8	5
Promedio de alelos	5.64	4.81	11.30	6.68	9.72	6.85	7.30	5.65	7.36	5.78

(n) = Número de genotipos analizados

* = Trabajo realizado en el CIAT, Colombia