



**Por un Desarrollo  
Agrario Integral  
y Sostenible**

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA  
DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN  
VEGETAL**

**Trabajo de Graduación**

**Caracterización Molecular de 52  
Accesiones de yuca (*Manihot esculenta*  
Crantz) usando nueve marcadores tipo  
SSR, CNIAB- INTA, Nicaragua**

**AUTOR:**

**Br. Jecsa Nubia Argüello Díaz**

**ASESORES:**

**Dr. Víctor Aguilar Bustamante**

**MSc. Erwin Aragón Obando**

**MANAGUA, NICARAGUA  
ABRIL, 2012**



“Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible”

# **UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

## **FACULTAD DE AGRONOMÍA DEPARTAMENTO DE PRODUCCIÓN VEGETAL**

### **TRABAJO DE GRADUACIÓN**

**Caracterización Molecular de 52 Accesiones de  
yuca (*Manihot esculenta* Crantz) usando nueve  
marcadores tipo SSR, CNIAB- INTA, Nicaragua**

#### **AUTOR:**

**Br. Jecsa Nubia Argüello Díaz**

#### **ASESORES:**

**Dr. Víctor Aguilar Bustamante**

**MSc. Erwin Aragón Obando**

Presentado a la consideración del excelentísimo tribunal  
examinador como requisito parcial para optar al título de  
ingeniera agrónoma generalista

**MANAGUA, NICARAGUA**

**ABRIL, 2012**



"Por un Desarrollo Agrario  
Integral y Sostenible"

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
SECRETARIA FACULTATIVA**

Este trabajo de graduación fue evaluado y aprobado por el honorable tribunal examinador designado por la Decanatura en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional Agraria como requisito parcial para optar al título profesional de:

**INGENIERIA AGRONOMA**

Miembro del Tribunal Examinador:

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos Henry Loaisiga  
Presidente

  
\_\_\_\_\_  
Ing. M.Sc. Vidal Marín Fernández  
Vocal

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Guillermo Reyes Castro  
Secretario

Managua, 19 de Abril del 2012

## ÍNDICE DE CONTENIDO

| SECCIÓN   | PÁGINA |
|---|--------|
| DEDICATORIA   | i      |
| AGRADECIMIENTO  | ii     |
| ÍNDICE DE CUADROS                                       | iii    |
| ÍNDICE DE FIGURAS                                       | iv     |
| ÍNDICE DE ANEXOS  | v      |
| RESUMEN   | vi     |
| ABSTRACT  | vii    |
| <b>I. INTRODUCCIÓN</b>                                  | 1      |
| <b>II. OBJETIVOS</b>                                    | 3      |
| 2.1 Objetivo general                                    | 3      |
| 2.2 Objetivos específicos                               | 3      |
| <b>III. MATERIALES Y METODOS</b>                        | 4      |
| 3.1 Ubicación del estudio                               | 4      |
| 3.2 Sitios donde se realizó la colecta                  | 4      |
| 3.3 Descripción de las accesiones estudiadas            | 5      |
| 3.4 Selección del material para la extracción de ADN    | 6      |
| 3.5 Extracción de ADN                                   | 7      |
| 3.6 Ampliación de ADN                                   | 7      |
| 3.7 Electroforesis                                      | 8      |
| 3.8 Tamaño de los fragmentos                            | 9      |
| 3.9 Análisis de la información                          | 12     |
| 3.9.1 Diversidad genética                               | 12     |
| <i>Número de alelos por locus (<math>N_a</math>)</i>    | 12     |
| <i>Heterocigosidad observada (<math>H_{obs}</math>)</i> | 12     |
| <i>Heterocigosidad esperada (<math>H_{esp}</math>)</i>  | 12     |
| <i>Índice de Shannon</i>                                | 12     |
| <i>Frecuencia alélica</i>                               | 12     |
| <i>Contenido de información polimórfica (CIP)</i>       | 13     |
| 3.9.2 Estructura genética                               | 13     |
| <i>Análisis molecular de varianza</i>                   | 13     |

|   |    |
|---|----|
| <i>Distancia genética e Identidad genética</i>    | 13 |
| <i>Análisis de conglomerado</i>                   | 13 |
| <b>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>                 | 14 |
| 4.1 Diversidad genética                           | 14 |
| 4.1.1 Diversidad genética por locus               | 14 |
| <i>Número de alelos</i>                           | 14 |
| <i>Heterocigosidad observada y esperada</i>       | 14 |
| <i>Contenido de información polimórfica</i>       | 15 |
| <i>Índices de Shannon</i>                         | 15 |
| 4.1.2 Diversidad genética por grupo               | 16 |
| <i>Número de alelos</i>                           | 16 |
| <i>Heterocigosidad esperada y observada</i>       | 16 |
| <i>Frecuencia alélica de cada locus por grupo</i> | 17 |
| 4.2 Estructura genética                           | 22 |
| <i>Análisis molecular de varianza (AMOVA)</i>     | 22 |
| <i>Distancia e Identidad genética</i>             | 22 |
| <i>Análisis de conglomerado</i>                   | 23 |
| <b>V. CONCLUSIONES</b>                            | 26 |
| <b>VI. RECOMENDACIONES</b>                        | 27 |
| <b>VII. LITERATURA CITADA</b>                     | 28 |
| <b>VIII. ANEXOS</b>                               | 31 |

## **DEDICATORIA**

**A DIOS** y a la Santísima Virgen María, por haberme dado fortaleza espiritual, necesaria para llegar a culminar uno de los primeros logros de mi vida.

A mis padres por ser ese pilar fundamental, que cimienta la unidad familiar, siendo mi fuente de inspiración cada día.

A mi querida y bella Nicaragua, en la cual quiero contribuir con mi desempeño laboral y personal.

Br. Jecsa Nubia Argüello Díaz

## AGRADECIMIENTO

**A:**

Abuelit@s, ti@s, prim@s, porque siempre estuvieron pendiente de cualquier cosa que necesitara, por darme su amor y confianza, por compartir conmigo tiempo, miradas, sonrisas, palabras y sobre todo ABRAZOTES.

Ligia como olvidarte si soy afortunada en tenerte como tía y además como mi segunda mamá, agradezco tu apoyo familiar y económico en el transcurso de mis estudios. TE QUIERO

La Universidad Nacional Agraria que me acogió y me brindo abrigo y sobre todo conocimientos, a través de sus docentes, que con ahínco y esmero aportaron a mi formación y en especial al Dr. Guillermo Reyes por su apoyo incondicional, su amistad y sobre todo por transmitirme ese espíritu de juventud que lo hace ser tan especial.

Mi asesor de tesis Dr. Víctor Aguilar por el apoyo que me ha brindado, además fue el principal motivador para la realización de este trabajo de investigación en INTA, agradezco su apoyo incondicional en cada uno de los momentos difíciles que se presentaron durante el desarrollo de este trabajo, y en gran manera su empeño, atención y preocupación durante la trayectoria de este estudio. Agradezco de todo corazón su amistad y cariño incondicional que hicieron posible sentirme apoyada, segura y respaldada todo este tiempo.

INTA por brindarme la oportunidad de realizar mi trabajo de investigación y sobre todo por compartir y transmitirme conocimientos para mi formación, dándome como asesor de tesis al Ing. MSc. Erwin Aragón a quien agradezco el compartir y transmitirme sus conocimientos y sobre todo sus comentarios y opiniones hechas para que se realizara este trabajo, el tiempo que dedicó para referirse como un amigo y compartir experiencias de lo que es el ambiente laboral. Muchas Gracias y le deseo éxito.

Ing. MSc. Claudia Rivera de todo corazón muchas gracias por su apoyo, comprensión y cariño que me ha brindado durante estos meses de trabajo.

Mis amigos y amigas de toda la vida, especialmente a Kenia que ha estado conmigo, brindándome su amistad, apoyo, confianza y cariño en el transcurrir del tiempo y al escalonar uno más de los peldaños de mi vida.

Br. Jecsa Nubia Argüello Díaz

## ÍNDICE DE CUADROS

| <b>CUADRO</b>  | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| 1. Descripción del material usado en el presente estudio   | 5             |
| 2. Secuencias de los locus usados en el presente estudio   | 8             |
| 3. Parámetros de diversidad genética para marcadores microsatelitales, usados en el presente estudio | 15            |
| 4. Parámetros de diversidad genética por grupos utilizando marcadores microsatelitales               | 17            |
| 5. Análisis molecular de varianza  | 22            |
| 6. Distancia e identidad genética de Nei's (1973) en cinco grupos de yuca                            | 23            |

## ÍNDICE DE CUADROS

| <b>FIGURA</b>   | <b>PÁGINA</b> |
|---|---------------|
| 1. Ubicación de los departamentos donde se colectaron las accesiones de yuca para el presente estudio.  | 4             |
| 2. Uso de la cámara electroforesis (a) y el UPV transluminador Launch Doc-ITL (b) para visualizar el desplazamiento de las bandas de ADN (c). | 10            |
| 3. Distancia recorrida por las bandas de los alelos en el gel de agarosa metaphor al 4%.  | 11            |
| 4. Frecuencia alélica locus GA-5.   | 17            |
| 5. Frecuencia alélica locus GA-12.  | 18            |
| 6. Frecuencia alélica locus GA-134.   | 18            |
| 7. Frecuencia alélica locus SSRY-242.   | 19            |
| 8. Frecuencia alélica locus GA-126.   | 19            |
| 9. Frecuencia alélica locus GA-140.   | 20            |
| 10. Frecuencia alélica locus SSRY-100.  | 20            |
| 11. Frecuencia alélica locus GA-131.  | 21            |
| 12. Frecuencia alélica locus GA-121.  | 21            |
| 13. Dendograma obtenido con el coeficiente de similitud de Jaccard.   | 25            |

## ÍNDICE DE ANEXOS

| <b>ANEXO</b>   | <b>PÁGINA</b> |
|--|---------------|
| 1. Abreviaturas  | 31            |
| 2. Glosario  | 32            |
| 3. Gráfica logarítmica para obtener el tamaño de las bandas        | 35            |
| 4. Regla de ADN de 25 a 100 pb                                     | 36            |
| 5. Gradiente de temperatura para el anillamiento                   | 37            |
| 6. Preparación de soluciones que se usaron en la extracción de ADN | 37            |

## RESUMEN

Se realizó un estudio para determinar la variabilidad genética de 35 accesiones de yuca colectadas en territorio nicaragüense, se incluyó como material de referencia 14 accesiones introducidas del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Colombia y 3 introducidas de Brasil, con el objetivo de identificar duplicidad de accesiones y comparar la estructura genética de las accesiones colectadas en Nicaragua. Los análisis de diversidad se obtuvieron de los datos de 9 marcadores microsatélites tipo SSR. Se detectó un total de 47 alelos en los nueve microsatélites, el número de alelos varió de 3 a 9, con un valor medio de 5. El índice de diversidad genética fue alto de 0.61. El valor promedio del PIC fue de 0.60, demostrando que los marcadores más informativos y polimórficos fueron el SSRY 100, GA-131 y GA-12, con alto poder de discriminación. El análisis molecular de varianza mostró que la mayor diferencia existe dentro del grupo, no así entre grupo. La mayor distancia genética determinada entre los grupos fue entre el grupo de Matagalpa con las Internacionales, presentando menor distancia las RAAS con las Rio San Juan, mientras que el grupo de Río San Juan y RAAS, presentaron la mayor identidad genética. El análisis de conglomerado mostró un coeficiente de correlación cofenética de 0.82 el cual agrupó seis grupos genéticamente idénticos. La información genética obtenida permitirá reducir las accesiones idénticas y seleccionar las de interés genético, para garantizar un manejo sostenible de los recursos que se dispone en el banco de germoplasma del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB) del Instituto Nicaragüense de Tecnología Agropecuaria (INTA).

**Palabras clave:** *Manihot esculenta*, diversidad genética, SSR

## ABSTRACT

A study was conducted to determine the genetic variability of thirty five accessions of cassava (*Manihot esculenta* Crantz), collected in Nicaragua, In the present was included as reference material 14 accessions, obtained from International Center of Tropical Agriculture (CIAT) Colombia, end three more accessions from Brazil, with the objective to identify accessions duplicity and compare the genetic structure of accessions collected in Nicaragua. The diversity analyses data were obtained from data of nine microsatellite markers (SSR) type. Was detected a total of 47 alleles, in the nine microsatellites, the number of alleles varied from three to nine with ranged of 3 to 9, with an average of 5.22. The index of genetic diversity was low 0.2. The averaged value of the mean PIC was 0.61, demonstrating that the most informative and polymorphic markers were the SSRY-100, GA 12 and GA 5, with high power discriminatory. Molecular analysis of variance showed that the biggest difference exists within the group, not between group. The largest genetic distance determined between populations, was among population of Matagalpa vers Internationals, showing shortest distance the RAAS, with the added, while the population of Rio San Juan end RAAS showed the highest genetic identify. Cluster analysis showed a cophenetic correlation coefficient of 0.82 which grouped six genetically identical groups. The genetic information obtained will allow to reduce accessions obtained, and select those of genetic information collected will allow to reduce the accessions obtained, and select those of genetic material interest to assure sustainable managements of the resources that are available in the germplasm bank of the National Center Agricultural Research and Biotechnology (CNIAB) Institute Nicaraguans of Agricultural Technology (INTA).

**Key words:** *Manihot esculenta*, genetic diversity, SSR

## I. INTRODUCCIÓN

*Manihot esculenta* Crantz, comúnmente conocida como yuca, mandioca o cassava, es originaria de América Latina y el Noroeste de Brasil, se ha extendido a países del tercer mundo (África, Asia y América Latina). Es una planta diploide ( $2n= 36$  cromosomas), perenne, monoica de la familia Euphorbiaceae, alcanza alturas de 1-3 m, tallo leñoso formado por la alteración de nudo y entre nudos, de hojas simples y lobuladas, con flores masculinas más abundantes que las femeninas con relación 10:1 (Domínguez, 1982), las raíces son tuberosas y fibrosas, con capacidad de almacenamiento de almidones (Ceballos, 2003b). El principal valor económico de la yuca está representado en sus raíces por su alto contenido de almidón (25 a 30 %), aunque las hojas son más nutritivas ya que contienen proteínas (15 a 17 %), vitaminas y minerales. Las raíces y las hojas son consumidas por humanos y animales de manera muy variada, subproductos de la yuca pueden ser utilizados por la industria, principalmente a partir de su almidón (Ceballos y De la Cruz, 2003a).

El uso de yuca en muchos países representaría nuevas oportunidades en la industria, ya que puede ser utilizada como pegamento y alcohol (Henry *et al.*, 1998). Por otro lado, el mercado del almidón de yuca también tiene muchas posibilidades de crecimiento para uso industrial y humano, por su viscosidad y resistencia al congelamiento, puede ser utilizada en la elaboración de alfombras, látex de caucho, fabricación de salsas, talcos, papel, cartón, industria cosmética y farmacéuticos (Ceballos , 2000).

El mayor productor del mundo es Nigeria (África) con 32.6 millones de toneladas, seguido de Brasil con 22.5. En el 2010 la producción mundial de raíces frescas fue de 248.7 millones de toneladas (FAO, 2010). La yuca ocupa el cuarto lugar en el mundo como producto básico más importante después del arroz, el trigo y el maíz; siendo fuente de calorías y componente básico en la dieta de más de 1000 millones de personas de escasos recursos económicos (Morrillo, 2009b).

En Nicaragua el cultivo de yuca es de suma importancia, ya que además de ser utilizada para el consumo humano representado en diferentes platos gastronómicos, se está utilizando en la alimentación de animales como: aves, porcinos y bovino (MAGFOR, 2011). Es un cultivo tradicional manejado por pequeños productores de Nueva Guinea, Masaya, Granada, Carazo, Chinandega y León, en menores proporciones en el resto de los departamentos, representando el 70% de la producción en el Atlántico y el 30% en el Pacífico (MAGFOR *et al.*, 2011). Los rendimientos promedios oscilan en  $13.676 \text{ t.ha}^{-1}$ . Se estima que se cultivan 16.700 hectáreas que producen unas 228.4 mil toneladas, de estas se destinan 4.2 miles de toneladas para la industria nacional (obtención de almidón y harina), y como materia prima para la elaboración de concentrados para la alimentación de animales, 220 mil toneladas para consumo nacional (como verduras fresca, platos típicos, postres, otros), y 4.2 mil toneladas se exportan congelada y parafinada a los Estados Unidos, El Salvador y Costa Rica (IICA *et al.*, 2004).

Nicaragua tiene buen futuro para potencializar la producción nacional de yuca y aumentar niveles de exportación, debido a las diversas características que presenta el cultivo, tales como: tolerancia a la sequía, capacidad para producir en suelos degradados, tolerancia al estrés biótico (plagas y enfermedades) y suelos ácidos (INTA, 2010).

En los últimos diez años investigadores se han interesado en estudiar las propiedades nutricionales relacionadas a los contenidos de B-caroteno, iniciado estudios de mejora genética en el cultivo, haciendo uso de la biología molecular, mediante el desarrollo de técnicas biotecnológicas, como herramienta que permite acelerar y analizar procesos de investigación de forma rápida y precisa en el genoma, utilizando marcadores moleculares basados en las características de interés que se deseen estudiar (Morrillo, 2009a).

Una de las herramientas utilizadas en biotecnología para la selección de materiales representativos en mejoramiento genético es el uso de marcadores moleculares basados en técnicas PCR (Polymerase Chain Reaction, por sus siglas en inglés) (Wilches, 2004).

El INTA está dedicando estudios de mejora genética en cultivos que garanticen calidad nutricional, siendo la yuca uno en los componentes en los programas de mejora genética; por tanto está trabajando en la producción de semillas de yuca en el Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB), así como en la colecta y caracterización de accesiones de yuca, con el objetivo de conocer la diversidad genética existente en el país y utilizarlos en programas de mejoramiento genético. Con la caracterización de las accesiones estudiadas, se logrará identificar la diversidad existente y si existe duplicidad en las accesiones establecidas en el banco de germoplasma del CNIAB. De esta manera se contará con un banco que represente la riqueza genética existente en el país y sentará bases para futuras investigaciones genéticas en el cultivo de la yuca.

Para conocer la diversidad genética existente en el país se compararon las accesiones colectadas en territorio nacional y las accesiones de yuca introducidas del CIAT, Colombia y Brasil, de esta manera se lograron comparar todas las accesiones establecidas en el banco de germoplasma del INTA e identificar duplicidad de accesiones.

## **II. OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo general**

Caracterizar molecularmente treinta y cinco accesiones de yuca, colectadas en territorio nacional, catorce accesiones introducidas del CIAT- Colombia y tres accesiones de Brasil, en el CNIAB-INTA, Nicaragua.

### **2.2 Objetivos específicos**

2.2.1 Estimar la diversidad genética de cincuenta y dos accesiones de yuca, a través de marcadores moleculares tipo SSR (Secuencias Simples Repetidas).

2.2.2 Identificar duplicidad de las accesiones establecidas en el banco de germoplasma de yuca.

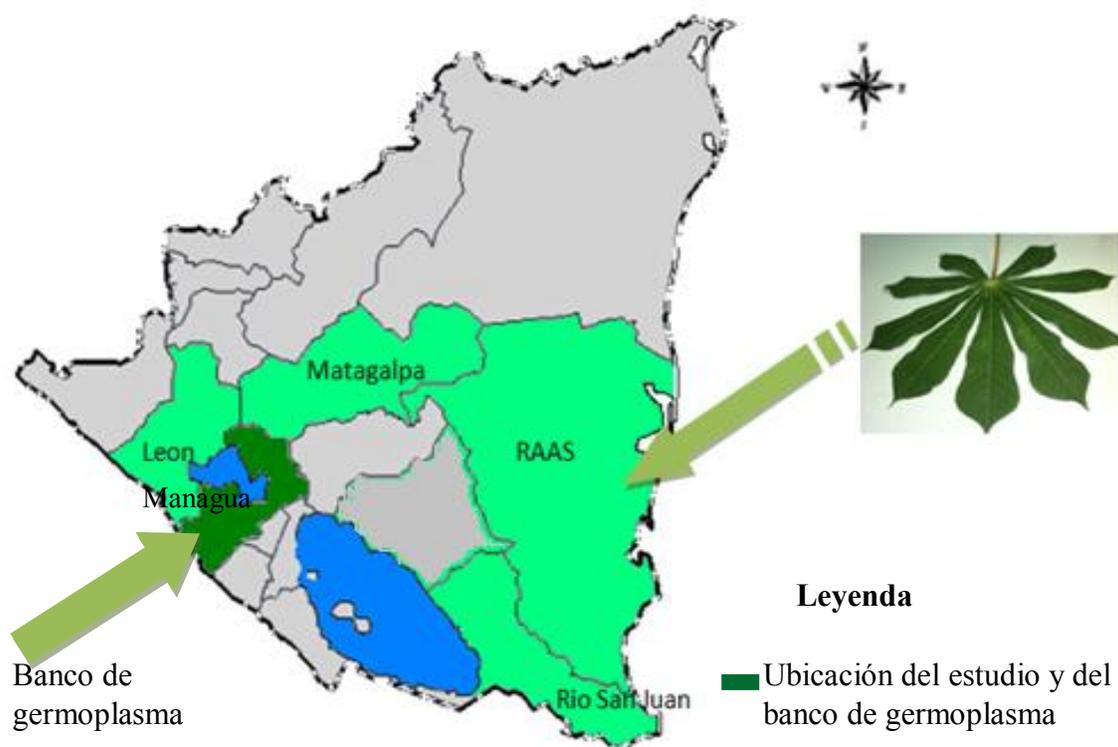
### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 Ubicación del estudio

El material establecido en el banco de germoplasma fue caracterizado en el laboratorio de Agrobiotecnología y Semilla del Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología (CNIAB-INTA), ubicado en el kilómetro 14.1 carretera Norte entrada a la Zonas Francas Privadas (ZFP) 2 kilómetros y medios al sur, en Managua.

#### 3.2 Sitios donde se realizó la colecta

Las accesiones de yuca usadas en el presente estudio fueron colectadas por el programa de manejo integrado de cultivo del INTA, durante el periodo 2010- 2011. En territorio nicaragüense se colectó un total de 35 varetas de 90 cm de longitud apropiadamente codificadas y subdivididas en estacas de seis cm. Todo el material fue sembrado en una parcela, para el establecimiento del banco de germoplasma en el INTA-CNIAB, incluyendo 14 accesiones introducidas del CIAT y tres accesiones introducidas de Brasil, para posterior caracterización. Las plantas seleccionadas en la colecta, fueron consideradas por su alto rendimiento, tiempo de cocción, color de la pulpa y resistencia a plaga, seleccionando una planta por parcela, donde se asumió que los productores tenían un solo clon.



**Figura 1.** Ubicación de los departamentos donde se colectaron las accesiones de yuca para el presente estudio.

### 3.3 Descripción de las accesiones estudiadas

En el Cuadro 1 aparecen las 35 accesiones colectadas en territorio nacional y las 17 accesiones procedentes del banco de germoplasma del CIAT, Colombia y Brasil. Las 17 accesiones se usaron para realizar comparaciones entre las accesiones existentes en territorio nacional. Para el estudio las accesiones se evaluaron según el lugar de procedencia; con el objetivo de obtener una muestra representativa se asociaron en cinco grupos: Internacionales 17 accesiones, León cuatro, Matagalpa tres, RAAS 19 y Río San Juan nueve.

**Cuadro 1.** Descripción del material usado en el presente estudio

| Entrada # | Código de la<br>accesión | Nombre de<br>colecta | Procedencia  | Departamento |
|-----------|--------------------------|----------------------|--------------|--------------|
| 1         | BGNY001                  | Algodón              | Nueva Guinea | RAAS         |
| 2         | BGNY002                  | Arbolito             | Nueva Guinea | RAAS         |
| 3         | BGNY003                  | Azucena 1            | San Carlos   | Río San Juan |
| 4         | BGNY004                  | Azucena 2            | San Carlos   | Río San Juan |
| 5         | BGNY005                  | BL Tex 0010Y         | Big lagoon   | RAAS         |
| 6         | BGNY006                  | BLG-007Y             | Big lagoon   | RAAS         |
| 7         | BGNY007                  | BLG-008Y             | Big lagoon   | RAAS         |
| 8         | BGNY008                  | BL-TEX 0011Y         | Big lagoon   | RAAS         |
| 9         | BGNY009                  | BL-TEX 009Y          | Big lagoon   | RAAS         |
| 10        | BGNY010                  | Bluefields           | Bluefields   | RAAS         |
| 11        | BGNY011                  | Castillo             | San Carlos   | Río San Juan |
| 12        | BGNY012                  | Ceiba                | Cinco cruces | León         |
| 13        | BGNY013                  | Chacaraseca          | Chacaraseca  | León         |
| 14        | BGNY014                  | Chalmeca 1           | San Carlos   | Río San Juan |
| 15        | BGNY015                  | Chalmeca 2           | San Carlos   | Río San Juan |
| 16        | BGNY016                  | CM 2772              | Colombia     | CIAT         |
| 17        | BGNY017                  | CM6119-7             | Colombia     | CIAT         |
| 18        | BGNY018                  | CM-523-7             | Colombia     | CIAT         |
| 19        | BGNY019                  | CM-6740-7            | Colombia     | CIAT         |
| 20        | BGNY020                  | CM-6921-3            | Colombia     | CIAT         |
| 21        | BGNY021                  | CM-773               | Colombia     | CIAT         |
| 22        | BGNY022                  | CM-7073-7A           | Colombia     | CIAT         |
| 23        | BGNY023                  | CR-31                | Colombia     | CIAT         |
| 24        | BGNY024                  | Cuapa                | Cuapa        | RAAS         |
| 25        | BGNY025                  | Isabel               | Cinco Cruces | León         |
| 26        | BGNY026                  | Jerusalén            | Río San Juan | Río San Juan |
| 27        | BGNY027                  | Melchorita           | San Carlos   | Río San Juan |
| 28        | BGNY028                  | Pata de paloma       | Nueva Guinea | RAAS         |

Cuadro 1. Continuación...

|    |         |               |                  |           |     |
|----|---------|---------------|------------------|-----------|-----|
| 29 | BGNY029 | Per-183       | Colombia         | CIAT      |     |
| 30 | BGNY030 | Per-183b      | Colombia         | CIAT      |     |
| 31 | BGNY031 | Poco sol      | San Carlos       | Río Juan  | San |
| 32 | BGNY032 | Quelite       | El Rama          | RAAS      |     |
| 33 | BGNY033 | Quintalera    | Nueva Guinea     | RAAS      |     |
| 34 | BGNY034 | RPL-002Y      | Laguna de Perlas | RAAS      |     |
| 35 | BGNY035 | RPL-003Y      | Rock Point       | RAAS      |     |
| 36 | BGNY036 | RPL-04Y       | Laguna de Perlas | RAAS      |     |
| 37 | BGNY037 | RPL-005Y      | Laguna de Perlas | RAAS      |     |
| 38 | BGNY038 | RPL-006Y      | Laguna de Perlas | RAAS      |     |
| 39 | BGNY039 | SM-805-15     | Cinco cruces     | León      |     |
| 40 | BGNY040 | Tulito        | San Carlos       | Río Juan  | San |
| 41 | BGNY041 | BL Tex-0012Y  | Rock Point       | RAAS      |     |
| 42 | BGNY042 | M-Col 219     | Colombia         | CIAT      |     |
| 43 | BGNY043 | Yema de huevo | Brasil           | Brasil    |     |
| 44 | BGNY044 | Dorada        | Brasil           | Brasil    |     |
| 45 | BGNY045 | MN-Gua 86     | Colombia         | CIAT      |     |
| 46 | BGNY046 | Jari          | Brasil           | Brasil    |     |
| 47 | BGNY047 | CM-6921       | Colombia         | CIAT      |     |
| 48 | BGNY048 | MCol 2694     | Colombia         | CIAT      |     |
| 49 | BGNY049 | Ceiba         | Rancho Grande    | Matagalpa |     |
| 50 | BGNY050 | Blanca        | Rancho Grande    | Matagalpa |     |
| 51 | BGNY051 | Morada        | Rancho Grande    | Matagalpa |     |
| 52 | BGNY052 | BL Tex 0012Y  | Big Lagoon       | RAAS      |     |

### 3.4 Selección del material para la extracción de ADN

Del banco de germoplasma se seleccionaron dos hojas jóvenes de cada una de las plantas según el nombre de colecta de su lugar de procedencia, se desinfectaron con alcohol y se secaron a temperatura ambiente durante tres días, se trituraron usando nitrógeno líquido. El material triturado se almacena en tubos falcon debidamente codificados a temperatura  $-20^{\circ}\text{C}$ , hasta la extracción de ADN.

### 3.5 Extracción de ADN

Para la extracción de ADN se utilizó el método de bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB), modificado por Siqueira *et al.*, (2009). Este método consiste en extraer ADN de tejido foliar joven, del material previamente triturado se pesó 50 mg de hoja en tubo eppendorf, al que se le adicionó 800  $\mu\text{l}$  (micro litros) de CTAB bufer (30 mM EDTA pH8, 0.1 M de TRIS- HCl pH8, 1.2 NaCl, 2% CTAB, 1% PVP, 0.2%  $\beta$ -Mercaptoethanol) precalentado en baño maría durante 15 minutos, se encubó las muestras durante 45 minutos en baño maría a temperatura de  $65^{\circ}\text{C}$  agitando la muestra en un vortex cada 15 minutos, transcurrido el tiempo se adicionó 500  $\mu\text{l}$  de Cloroformo isopentyl alcohol al 24:1 y se centrifugó a 8000 revoluciones por minuto (rpm) durante 10 minutos, se extrajo el sobrenadante a un nuevo tubo y se le adicionó 500  $\mu\text{l}$  de Cloroformo isopentyl alcohol y se centrifugó a 8000 rpm durante 10 minutos, posteriormente se extrajo 400  $\mu\text{l}$  de la solución sobrenadante y se le agrego 350  $\mu\text{l}$  de Isopropanol helado y se encubó 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  para precipitarlo, transcurrido este tiempo se centrifugó a 8000 rpm, durante 10 minutos, posteriormente se descartó el sobrenadante sin distorsionar el pellet y fue lavado con 200  $\mu\text{l}$  de etanol al 70%, volviendo centrifugar a 8000 rpm, durante 10 minutos, nuevamente se extrajo el sobrenadante sin distorsionar el pellet dejándolo secar por 1 hora a temperatura ambiente se re suspendió el pellet en 200  $\mu\text{l}$  de bufer TE. (10 mM tris HCl pH8 y 0.1 mM EDTA) y se almacenó a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta que las muestras fueron utilizadas para la PCR.

Para observar y evaluar las bandas de ADN se preparó gel de agarosa simple al 1% (Anexo 6.10), en la que se inyectó 1  $\mu\text{l}$  de bufer de carga 6X combinado con 5  $\mu\text{l}$  de ADN genómico, se dejó correr en la cámara electroforesis plus a 110 voltios, 400 amperios durante 45 minutos, transcurrido el tiempo se utilizó el transiluminador (High Performance UV) con la cámara Canom para tomar las fotografías las cuales fueron visualizadas con el programa lounch Doc-ITLS software de análisis de imagen, donde se identificaron las bandas de ADN.

### 3.6 Amplificación de ADN

Los pares de iniciadores para *Manihot esculenta* utilizados en el presente estudio fueron seleccionados por su alto nivel de polimorfismo, la mayoría contienen repeticiones G-A variables en su tamaño, fueron desarrollados por Chavariaga-Aguirre *et al.*, (1998), siendo utilizados en investigaciones realizadas en Brasil (Siqueira *et al.*, 2009) y en Nigeria (Dixon, 2002). La estandarización de las temperaturas óptimas de apareamiento de cada uno de los marcadores se determinó realizando gradiente de temperaturas (Anexo 5).

**Cuadro 2.** Secuencias de los locus usados en el presente estudio

| Locus                | Secuencia (5' a 3')       | Secuencia 3' a 5'         | *Ta<br>°C |
|----------------------|---------------------------|---------------------------|-----------|
| <b>GA-5</b>          | TAATGTCATCGTCGGCTTCG      | GCTGATAGCACAGAACACAG      | 50        |
| <b>GA-12</b>         | GATTCCTCTAGCAGTTAAGC      | CGATGATGCTCTTCGGAGGG      | 50        |
| <b>GA-21</b>         | GGCTTCATCATGGAAAAACC      | CAATGCTTTACGGAAGAGCC      | 48        |
| <b>GA-126</b>        | AGTGGAATAAGCCATGTGA<br>TG | CCCATAATTGATGCCAGGTT      | 53        |
| <b>GA-131</b>        | TTCCAGAAAGACTTCCGTTCA     | CTCAACTACTGCACTGCACT<br>C | 53        |
| <b>GA-134</b>        | ACAATGTCCCAATTGGAGGA      | ACCATGGATAGAGCTCACCG      | 50        |
| <b>GA-140</b>        | TTCAAGGAAGCCTTCAGCTC      | GAGCCACATCTACTCGACAC<br>C | 48        |
| <b>SSR-242</b>       | TGGGTTCGAAAACAGCAAAC      | TAATGCCTGGAGGGTAATGG      | 48        |
| <b>SSRY-<br/>100</b> | ATCCTTGCTGACATTTTGC       | TTCGCAGAGTCCAATTGTTG      | 48        |

Chavariaga-Aguirre *et al.*, 1998

\*Ta. Temperatura de alineamiento

Para la amplificación de ADN se utilizó una máquina PCR Eppendorf Mastercycler con gradiente termociclador. La mezcla PCR estuvo compuesta por 12.5 µl de PCR Master mix (Taq polimerasa 50 U/ µl, 400 µl de cada una de los siguientes compuestos: dATP, dGTP, dCTP, dTTP y 3mM MgCl<sub>2</sub>), 2 µl de cada iniciador hacia delante y reverso, 2 µl de ADN de cada muestra molde proveniente de la extracción, 6 µl de Mq agua calidad PCR.

Para la amplificación de las muestras en la PCR se utilizó el siguiente programa: En la primera desnaturalización 4 min a 95 °C, seguido por 29 ciclos de 1 min a 95 °C en la segunda desnaturalización, 2 min a la temperatura de alineamiento definidos para cada iniciador, 2 min a 72 °C en la extensión, y una etapa de extensión final de 1min a 72<sup>0</sup>C (Siqueira *et al.*, 2009). La reacción de amplificación se corrió en un volumen de total de 25 µl, por muestra.

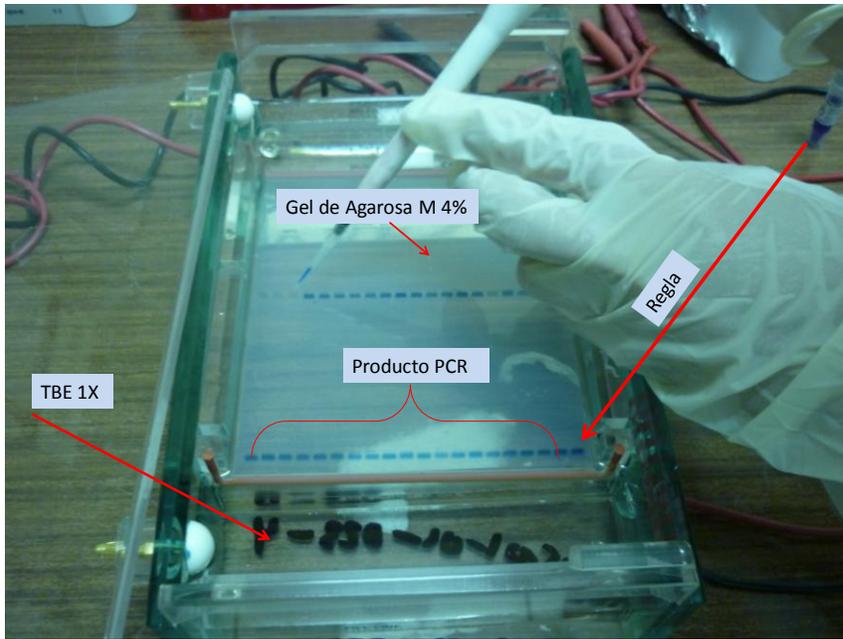
### **3.7 Electroforesis**

A las cámaras se les adicionó 600 ml de TBE 1X mezclado con 25 µl de bromuro de etidio, (cuya función es adherirse de manera irreversible entre los componentes del ADN), posteriormente se prepara gel de agarosa metaphor se vertió en la carcasa, se le colocaron dos peinetas de 20 cm cada diente y se dejó secar durante 20 minutos, se colocaron en las cámaras de electroforesis Plus y se retiraron las peinetas y en cada uno de los pozos se inyectó 1 µl de 6X loading y 5 µl de ADN producto PCR respectivo por marcador, excepto en cada uno de los primeros extremos de la gel se cargó el primer pozo con 6 µl de regla de ADN con capacidad de más de 100 pares de bases (pb), se dejó correr a 110 voltios, 140 vatios por 60 minutos con Amperaje de 400 (Figura 2). Todos los fragmentos de ADN productos PCR, se visualizaron y cuantificaron, al obtener la fotografía de las geles de agarosa metaphor al 4% (Figura 3).

### **3.8 Tamaño de los fragmentos**

Transcurrido el tiempo en la electroforesis se llevó la gel al transluminador con cámara Canon de 12.5 mega pixeles, para tomar fotografías las cuales fueron visualizadas con el programa lounch Doc-ITLS software de análisis de imagen, donde se identificaron las bandas de ADN (Figura 2)

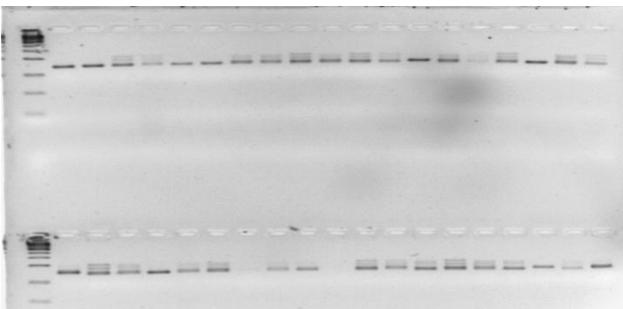
El tamaño de los fragmentos se calculó mediante la aproximación exponencial (EXCEL 2007) a partir de los datos de marcadores microsatelitales (Anexo 3).



a. Cámara electroforesis



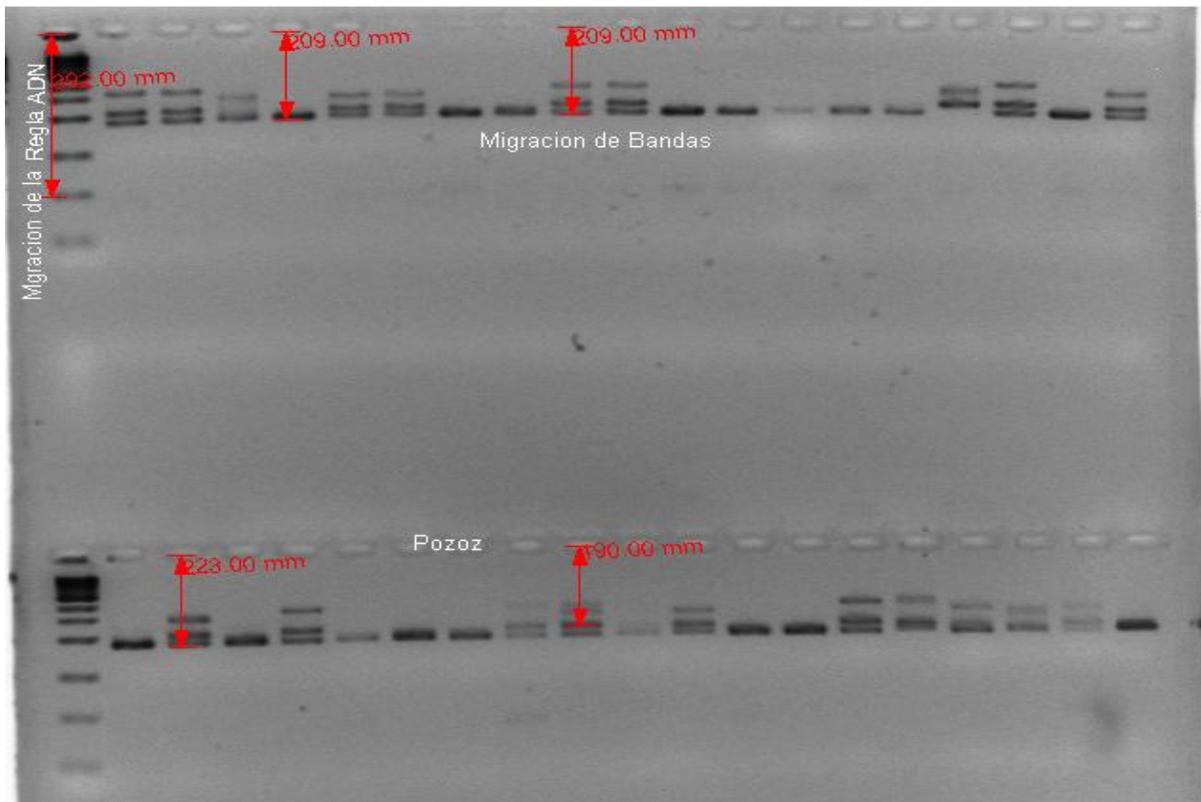
b. UPV trasluminador Launch Doc-ITL



c. Visualización del desplazamiento de bandas de ADN

**Figura 2.** Uso de la cámara electroforesis (a) y el UPV trasluminador Launch Doc-ITL (b) para visualizar el desplazamiento de las bandas de ADN (c).

Las distancias corridas por cada una de las bandas de alelo de las muestras por marcador se calcularon de forma manual, utilizando la propiedad (Measurelength) del programa launch Doc-ITLS software de análisis de imagen (Figura 3).



**Figura 3.** Distancia recorrida por las bandas de los alelos en gel de agarosa metaphor al 4%.

La figura 3 muestra cómo se realizaron las medidas de migración de las bandas de los alelos producto PCR utilizando el programa Launch Doc-ITLS usando de la propiedad Measurelength (mascarilla o microelemento). En la parte izquierda se muestra la regla exACTGene 100 pb PCR ADN con escala 100, cargando 25 bp-1,000 pb, utilizada para medir la distancia de migración (Anexo 4), la lectura se realizó utilizando de referencia la medida en cm de la migración del rango de pares de bases de la regla comparándolo con el rango migrado por la banda del alelo.

### 3.9 Análisis de la información

#### 3.9.1 Diversidad genética

Para evaluar la diversidad genética se estimaron los parámetros siguientes: número de alelos por locus ( $N_a$ ), heterocigosidad esperada ( $H_{esp}$ ), heterocigosidad observada ( $H_{obs}$ ) y la frecuencia alélica ( $P_i$ ). Estos cálculos fueron obtenidos haciendo uso del programa GenAlex versión 6.2. (Peakall y Smouse, 2006).

##### *Número de alelos por locus ( $N_a$ )*

Constituye todas las formas alternativas que puede presentar un gen en un locus. Se determina por conteo directo de alelos diferentes para cada locus en cada grupo. Este parámetro se determinó utilizando el software de GenAlex versión 6.2 (Peakall y Smouse, 2006).

##### *Heterocigosidad observada ( $H_{obs}$ )*

Equivale a la proporción de individuos que presenta un par de alelo diferente, es decir que son heterocigotos, mediante conteo directo, para cada locus en un grupo (Casalla, 2003).

##### *Heterocigosidad esperada ( $H_{esp}$ )*

Es llamada también índice de diversidad de Weir y estima la proporción de individuos que se espera sean heterocigotos para cada locus en un grupo (Casalla, 2003).

##### *Índices de Shannon ( $I$ )*

Para el análisis de diversidad se utilizó el método índice de Shannon, el cual consiste en determinar la diversidad de especies o individuos a través de comparaciones. El índice de diversidad de Shannon es típicamente usado para medir el número de especies en una comunidad (la riqueza) y la relativa frecuencia de estas especies. El índice contempla la cantidad de especies presentes en el área de estudio, riqueza de especies, y la cantidad relativa de individuos de cada una de esas especies abundantes (Di Betetti, M, 2000).

El índice de Shannon se calculó para cada locus y grupos usando versión del software GenAlex ver. 6.1. (Peakall y Smouse, 2006)

##### *Frecuencia alélica*

Es el número de veces que se observa un alelo, dentro del total de alelos para un locus. Es usada para describir toda la información genética presente en un locus (Casalla, 2003).

### ***Contenido de información polimórfica (CIP)***

Estimación de la diversidad que permite clasificar los marcadores genéticos según su nivel de polimorfismo y mide la capacidad discriminatoria de los locis, en dependencia del número de alelos y la frecuencia de cada alelo en el locus marcador (Murillo, 2010). Para calcular el Contenido de información polimórfica (CIP), se usó la siguiente fórmula propuesta por (Anderson *et al.*, 1993).

$$CIP= 1-\sum(p^2_{i_j})$$

Donde  $P_i$ : frecuencia alélica del  $i$ -ésimo alelo,  $j$  el locus.

### **3.9.2 Estructura genética**

#### ***Análisis molecular de varianza***

Para cuantificar la diversidad genética se utilizó el análisis molecular de varianza, es un marco de referencia para la estimación de estructura genética a partir de la información contenida en la frecuencia alélica, y el estimador de F-estadística (FST) y a partir de ella se obtienen los componentes de covarianza asociados con posibles niveles de estructura genética, según lo descrito por (Weir Cockerham, 1984), utilizando el software GenAlex ver. 6.1 (Peakall y Smouse, 2006).

#### ***Distancia genética e Identidad genética***

La distancia genética es la estimación entre dos individuos que pueden ser descrita por la variación alélica (Nei, 1973). Determina la lejanía entre un grupo y otro basada en la frecuencia de alelos de ambos grupos.

La identidad genética ( $D_i$ ) y la distancia genética ( $D$ ) se obtuvieron según Nei, 1978, mediante el software POPGENE versión 3.2 (Yeh y Boyle, 1997).

#### ***Análisis de conglomerado***

La representación gráfica de las accesiones al compararlas entre sí fue obtenida, a través del análisis de conglomerados (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) y el método UPGMA generado por Jaccard usando nueve pares de iniciadores microsatelitales. Este análisis permite representar gráficamente las distancias genéticas entre cada uno de los grupos, el cual genera gráficos de agrupamiento, generando un estimado de la aproximación entre individuos, para el análisis se utilizó el software Infogen v.6.2.

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Diversidad genética

#### 4.1.1 Diversidad genética por locus

##### *Número de alelos*

Se encontraron 47 alelos usando nueve cebadores, en 35 accesiones de yucas nacionales y 17 accesiones introducidas. Los cebadores revelaron ser discriminativos al identificar alto nivel de polimorfismo para el material de yuca analizado, según lo descrito por Casalla (2003), un marcador es altamente polimórfico cuando identifica más de dos alelos por locus; el número de alelos amplificados por locus presentó valores comprendidos entre 3-9, con un promedio de 5 alelos por locus (Cuadro 3). El GA-140 y el GA-134 identificaron el menor número de alelos, seguido del iniciador GA-5, GA-21 y GA-126 identificando 4 alelos respectivamente. Los iniciadores que identificaron mayor número de alelos fueron el GA-131 y el SSRY 100 (Cuadro 3). El valor del rango de número de alelos observados identificados en el presente estudio se encontró dentro del rango 2-10 encontrado por Beovides *et al.*, (2006), esto comprueba que los cebadores usados en este estudio son polimórficos según Chavarriaga-Aguirre *et al.*, (1998).

Los cebadores utilizados para la amplificación produjeron fragmentos con rangos de pares de bases entre 90 a 400, el iniciador GA-131 identificó los fragmentos con menores rangos comprendido entre 90-162 y el GA-134 identificó el de mayor rango entre 308-400 (Cuadro 3). Los rangos de pares de bases obtenidas en el presente estudio mostraron similitud a los rangos encontrados en el estudio de Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998), cuyos valores fueron de 95 a 310 pb en sus respectivos microsatélites utilizados.

##### *Heterocigosidad observada y esperada*

La estimación de heterocigosidad para las diferentes accesiones analizados por locus, presentaron baja heterocigosidad observada ( $H_{obs}$ ), con valor promedio de 0.15, variando entre 0.00 a 0.40, valores ya encontrados en otros estudios utilizando estos marcadores Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998, 1999), citado por (Zaldivar, 2006). Esto confirma que la yuca por naturaleza es heterocigota y que la forma de reproducción influye en los niveles de heterocigosidad, es decir que al reproducirse de manera asexual las características genéticas son heredadas de generación en generación, manteniendo heterocigosidad observada, aunque algunas veces es probable que en la determinación del genotipo, el ADN sea no codificante por lo tanto no se encontrarían valores de heterocigosidad observada. La heterocigosidad esperada fue alta con valor promedio de 0.61 ( $H_{esp}$ ) cuyo valor representa que los niveles de heterocigosidad serían altos si se utilizara el medio de reproducción sexual cruzada, lo que generaría alta diversidad genética. Chavarriaga-Aguirre *et al.* (1998), en su análisis obtuvieron rangos promedios de  $H_{esp}$  de 0.684 y  $H_{obs}$  de 0.265, estos resultados fueron muy semejantes a los obtenidos en el presente estudio.

El mayor nivel de heterocigosidad esperada fue expresado por el cebador GA-131 con valor de 0.82 y el menor valor lo expresó el marcador GA-134 con 0.31. Estas variaciones se deben a que cada microsatélites codifica una región específica del ADN de cada genotipo y a la variación en tamaño de cada microsatélites.

### ***Contenido de información polimórfica***

En el análisis la estimación del PIC, mostró comportamiento alto ( $PIC > 0.5$ ), esto indica que los cebadores fueron muy discriminativos con la información generada en los locus estudiados. El marcador GA-134 presentó el valor más bajo con 0.30, este fue el marcador que identifica tener el nivel más bajo de polimorfismo. El resto de los marcadores presentaron valores entre el rango 0.46 a 0.81, destacándose con el mayor valor de efectividad de información el marcador GA-131, los datos obtenidos muestran que los microsatélites utilizados en el estudio son altamente polimórficos, esto comprueba lo descrito por (Siqueira *et al.*, 2009), quienes seleccionaron 9 marcadores altamente polimórficos, de los cuales 7 fueron incluidos en el presente estudio.

### ***Índice de Shannon***

El índice de diversidad de Shannon mostró media de 0.87, el menor valor fue expresado por el marcador GA-134 con rango de 0.33 y el mayor valor lo presentó el marcador GA-131 con 1.41 (Cuadro 3), esto indicó alta riqueza de individuos presentes en el estudio, según los datos obtenidos del análisis del índice de Shannon. Los marcadores GA-131 con 1.41 y SSRY-100 con 1.36 presentaron los valores más altos de efectividad y mayor diversidad de individuos en el locus.

**Cuadro 3.** Parámetros de diversidad genética para marcadores microsatelitales, usado en el presente estudio

| <b>Locus</b>               | <b>Rango (pb)</b> | <b>Na</b> | <b>H<sub>obs</sub></b> | <b>H<sub>esp</sub></b> | <b>PIC</b> | <b>I</b> |
|----------------------------|-------------------|-----------|------------------------|------------------------|------------|----------|
| GA-5                       | 132-162           | 4         | 0.00                   | 0.68                   | 0.68       | 0.83     |
| GA-12                      | 152-224           | 7         | 0.34                   | 0.75                   | 0.75       | 1.21     |
| GA-21                      | 112-158           | 4         | 0.00                   | 0.47                   | 0.46       | 0.56     |
| GA-126                     | 148-270           | 4         | 0.30                   | 0.66                   | 0.65       | 1.01     |
| GA-131                     | 90-162            | 9         | 0.40                   | 0.82                   | 0.81       | 1.41     |
| GA-134                     | 308-400           | 3         | 0.00                   | 0.31                   | 0.30       | 0.33     |
| GA-140                     | 172-198           | 3         | 0.00                   | 0.47                   | 0.46       | 0.43     |
| SSR-242                    | 248-372           | 5         | 0.00                   | 0.52                   | 0.51       | 0.72     |
| SSRY-100                   | 178-290           | 8         | 0.30                   | 0.80                   | 0.79       | 1.36     |
| <b>Media</b>               |                   | 5         | 0.15                   | 0.61                   | 0.60       | 0.87     |
| <b>Desviación estándar</b> |                   | 2         | 0.18                   | 0.18                   | 0.18       | 0.18     |

Rangos de pares de bases (pb) de microsatelites, número de alelos encontrados (Na), heterocigosidad observada (H<sub>obs</sub>) heterocigosidad esperada (H<sub>esp</sub>), contenido de información polimórfica (PIC) e índices de shannon por locus (I).

#### 4.1.2 Diversidad genética por grupo

##### *Número de alelos*

Los índices de diversidad genética para los cebadores estudiados en cada una de los cinco grupos, presentaron números de alelos comprendidos entre 1.78 y 4.56. El grupo de la RAAS alcanzó el mayor número de alelos con un valor de 4.56, seguido del grupo internacional con 4.44, estos dos grupos al analizarse el número de individuos fue mayor al número analizado en el resto de los grupos; el grupo de Matagalpa mostró el número más bajo de alelos con valor de 1.78, seguido del grupo de León con valor de 2.22, siendo estos dos los grupos con menor número de individuos. Es decir que el menor o mayor número de alelos encontrados puede estar influenciado posiblemente a la cantidad de muestras analizadas en respectivos grupos, (Zaldivar, 2006).

##### *Heterocigosidad esperada y observada*

La heterocigosidad observada con valor medio de 0.15 mostró variación de 0.13 a 0.19, mientras que la heterocigosidad esperada vario de 0.23 a 0.63, con valor medio de 0.48, es decir que heterocigosidad se mantiene debido a que la heterosis es un fenómeno común en este cultivo (Elias *et al.*, 2001, Olsen & Schall 2001, Rocha *et al.*, citado por Zaldivar, 2006). La heterocigosidad esperada fue media, según lo descrito por (Holsinger, s. f), la heterocigosidad esperada es considerada alta cuando expresa valores mayores a 0.5, es decir que aumenta cuando se acerca a 1, y disminuye cuando se acerca a 0; por tanto cuando se encuentran valores mayores a 0.5 se dice que existe alta diversidad genética. El mayor índice de heterocigosidad observada lo expresó el grupo de Matagalpa con 0.19 y la RAAS con 0.18, el grupo de Matagalpa tenía el menor número de individuos para el análisis, no así el grupo de la RAAS que tenían el mayor número de individuos, por lo que consideramos que, aunque el número de individuos analizados en estos dos grupos es muy diferente, se atribuye la posible existencia de heterocigosidad existente tiene ciertas implicaciones de selección por los productores, principalmente en este cultivo, donde el principal atractivo es la raíz, esto explica la similitud entre el valor de heterocigosidad de la RAAS con el grupo de Matagalpa, debido a que la finalidad de la producción del cultivo de yuca en el departamento de la RAAS es para el comercio, lo que indica que al momento de establecer las parcelas no hay selección del material con ancestro altamente productivo, mientras que la producción de yuca en Matagalpa generalmente es utilizada para el autoconsumo, por lo tanto atribuimos que el productor antes de establecer la parcela hace escogencia de un limitado número de material procedente de plantas que presentaron mayor tamaño y mejor calidad de la raíz por ende mayor resistencia a plagas, siendo este el material a usar para la próxima generación (Gazoli *et al.* 2000, Elias *et al.* 2001, citado por Zaldivar, 2006).

El índice de diversidad de Shannon evidenció que la riqueza de individuos analizados en el grupo de Matagalpa fue de menor tamaño, en comparación a la riqueza analizada en los grupos de las accesiones de la RAAS e Internacionales, que fueron las de mayor tamaño.

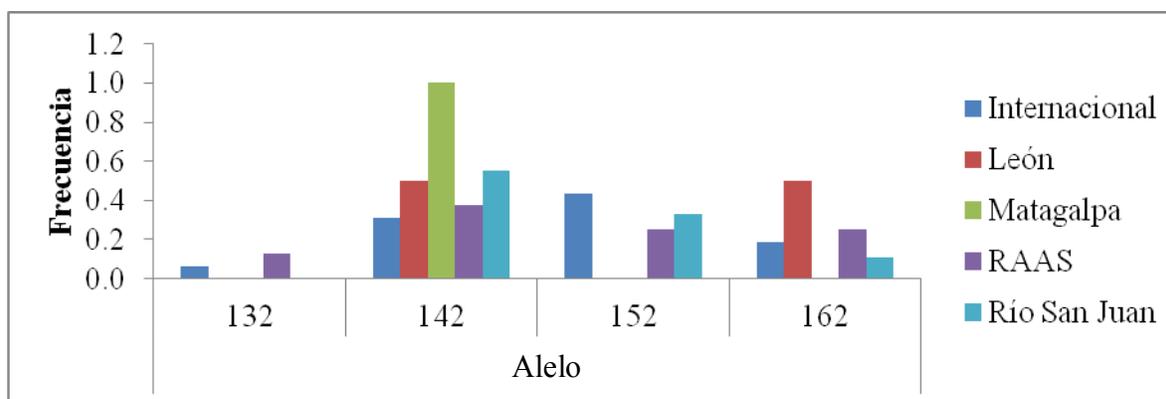
**Cuadro 4.** Parámetros de diversidad genética por grupos utilizando marcadores microsatelitales

| Grupos          | n  | N     | Na   | I    | H <sub>obs</sub> | H <sub>esp</sub> |
|-----------------|----|-------|------|------|------------------|------------------|
| Internacionales | 17 | 14.67 | 4.44 | 1.19 | 0.13             | 0.63             |
| León            | 4  | 3.67  | 2.22 | 0.64 | 0.11             | 0.40             |
| Matagalpa       | 3  | 2.44  | 1.78 | 0.38 | 0.19             | 0.23             |
| RAAS            | 19 | 15.89 | 4.56 | 1.11 | 0.18             | 0.56             |
| Río San Juan    | 9  | 8.67  | 3.56 | 1.04 | 0.13             | 0.58             |
| <b>Media</b>    |    |       |      |      | 0.15             | 0.48             |

Número de individuos analizados (n), individuos analizados (N), número de alelos encontrados (Na), Índices de Shannon (I), heterocigosidad observada (H<sub>obs</sub>) y heterocigosidad esperada (H<sub>esp</sub>) para los cinco grupos formados por las accesiones Internacionales, León, Matagalpa, RAAS, y Río San Juan.

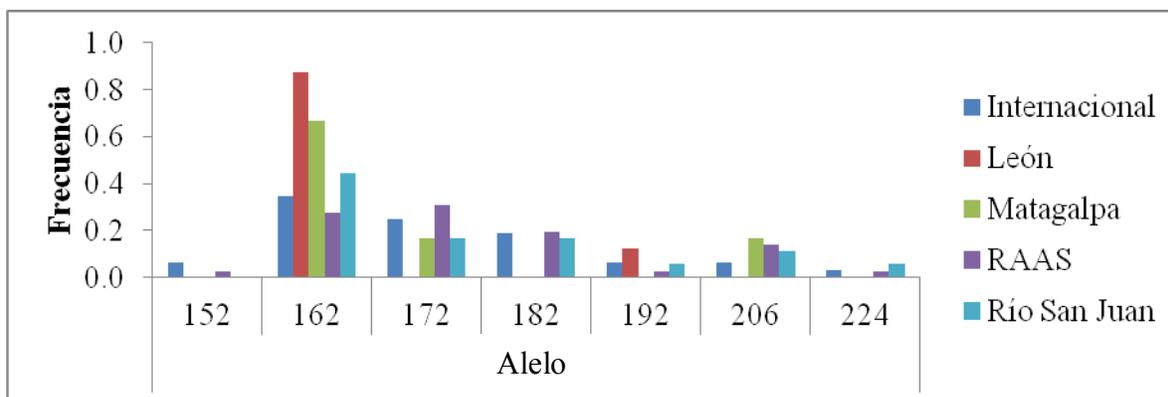
#### *Frecuencia alélica de cada locus por grupo*

El cebador GA-131 identificó nueve alelos, seguido del cebador SSRY-100 con frecuencia de 8 alelos y GA-12 con frecuencia de 7 alelos. En los grupos que se identificaron mayores frecuencias alélicas fue el de la RAAS, seguido del grupo de las accesiones Internacionales, Río San Juan y León. El grupo de Matagalpa presentó menor frecuencia alélica en todos los locus analizados.



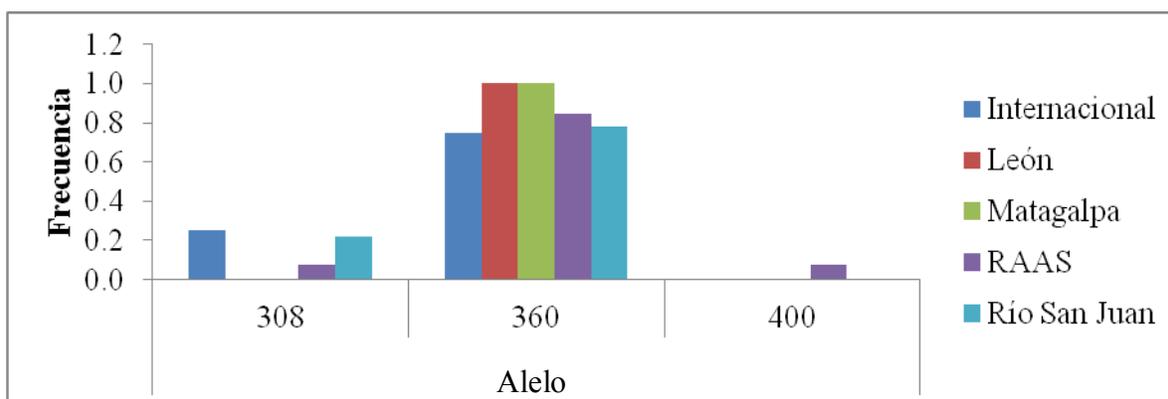
**Figura 4.** Frecuencia alélica locus GA-5.

La Figura 4 identifica frecuencia de 4 alelos, el alelo 142 presentó mayor frecuencia en los cinco grupos estudiados, no así el alelo 132 que únicamente estuvo presente en los grupos de accesiones Internacionales y RAAS. Los alelos 142 y 162 son dominantes para un carácter común en determinados grupos.



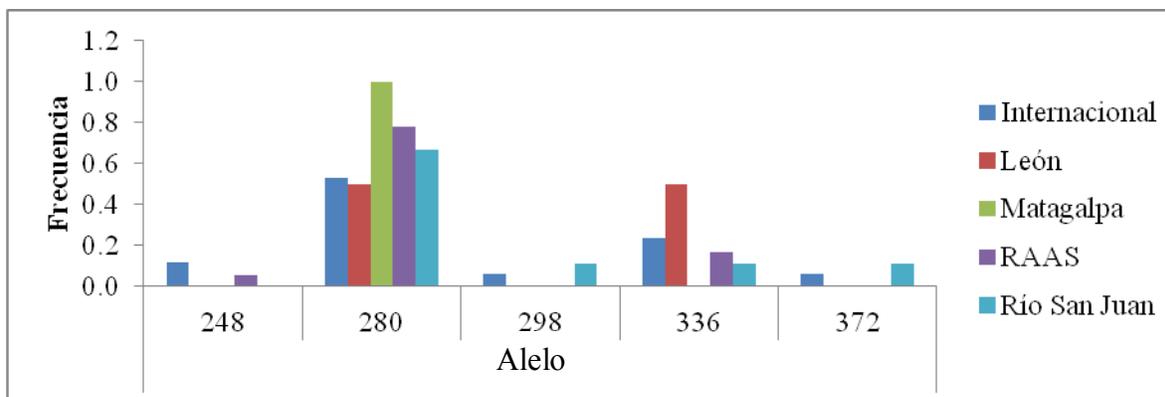
**Figura 5.** Frecuencia alélica locus GA-12.

La Figura 5 muestra frecuencia de 7 alelos, el alelo 162 mantuvo frecuente en los cinco grupos analizados, mostrando mayor frecuencia en el grupo de las accesiones de León y Matagalpa, indicando que tiene mayor dominancia para el carácter de este alelo. Los 7 alelos frecuentes identificados por el cebador GA-12 son comunes entre los grupos de las accesiones Internacionales y las accesiones de la RAAS. El carácter de los alelos 152 y 224 presentó menor frecuencia por tanto menor dominancia.



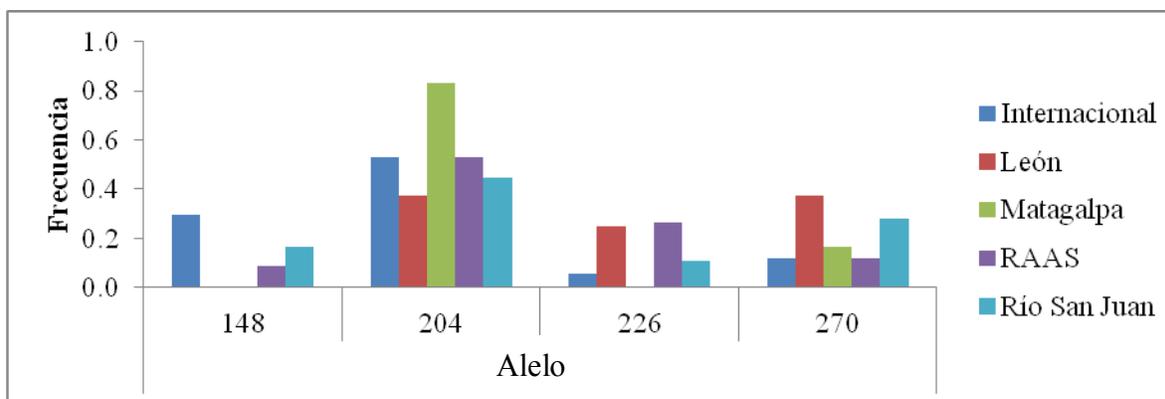
**Figura 6.** Frecuencia alélica locus GA-134.

La Figura 6 muestra que el cebador GA-134 presentó tres alelos frecuentes en el grupo de la RAAS, mientras que el alelo 360 mostró alta frecuencia en los cinco grupos estudiados es decir que este alelo es dominante en los cinco grupos, para el grupo de la RAAS el alelo 400 presentó baja frecuencia al igual que el alelo 308.



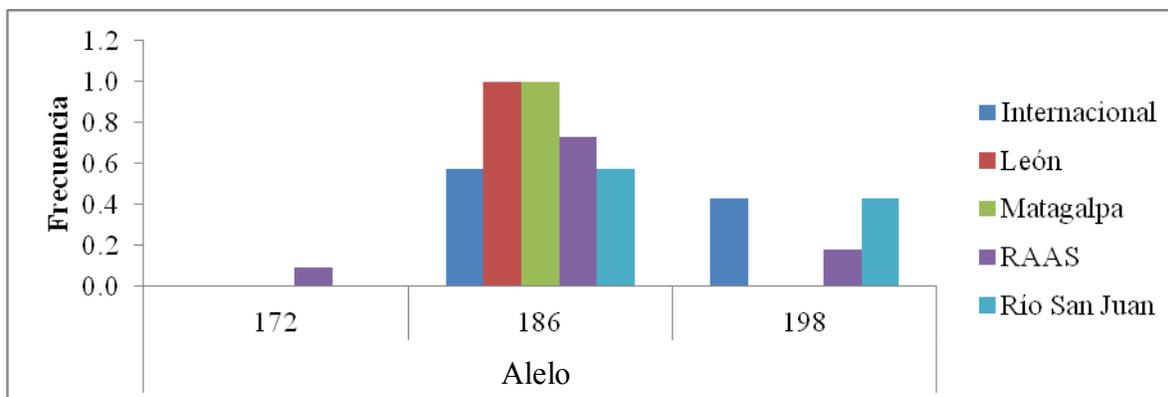
**Figura 7.** Frecuencia alélica locus SSRY-242.

La Figura 7 muestra que el cebador SSRY-242 identificó 5 alelos frecuentes, de los cuales el alelo 280 estuvo en los cinco grupos, los alelos 372 y 298 mostraron baja frecuencia en el grupo de las accesiones internacionales y Río San Juan. El alelo 336 mantuvo frecuencia en cuatro de los grupos no mostrándose en el grupo de Matagalpa.



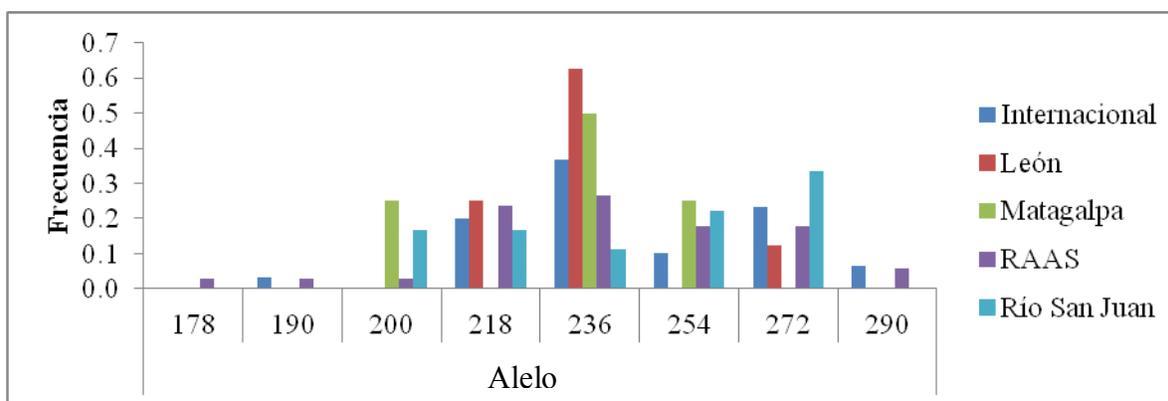
**Figura 8.** Frecuencia alélica locus GA-126.

La Figura 8 muestra que el locus GA-126 encontró frecuencia de cuatro alelos, donde el alelo 204 y el 270 estuvieron frecuentes en las cinco poblaciones, para el alelo 204 la frecuencia fue mayor en comparación a la frecuencia identificada para el alelo 270, es decir que el carácter que determina el alelo 204 es más dominante al carácter del alelo 270, ya que ambos alelos se mostraron en las cinco poblaciones, mientras que el alelo 226 estuvo frecuente en cuatro de los grupos, identificando mayor frecuencia para los grupos de las accesiones de RAAS y León y la menor frecuencia para las accesiones Internacionales y Río San Juan.



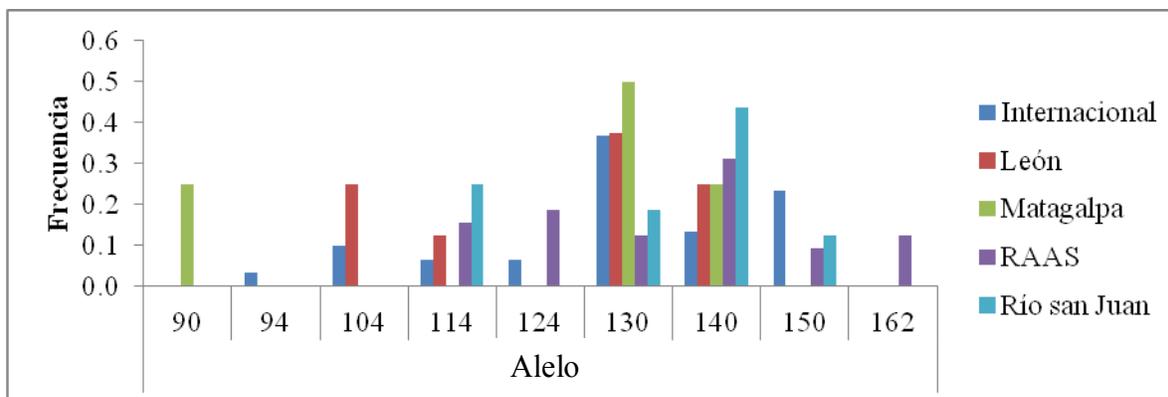
**Figura 9.** Frecuencia alélica locus GA-140.

La Figura 9 muestra que el locus GA-140 encontró frecuencia de tres alelos, de ellos el alelo 186 estuvo frecuente en los cinco grupos, el carácter del alelo 186 mostró mayor frecuencia para los grupos de León y Matagalpa y frecuencia más baja para el resto de los grupos, el alelo 172 presentó mínima frecuencia en la población de las accesiones Internacionales, mientras que el alelo 198 mostró frecuencia en los grupos de las accesiones Internacionales, RAAS y Río San Juan. Los tres alelos mostraron frecuencia en las accesiones Internacionales.



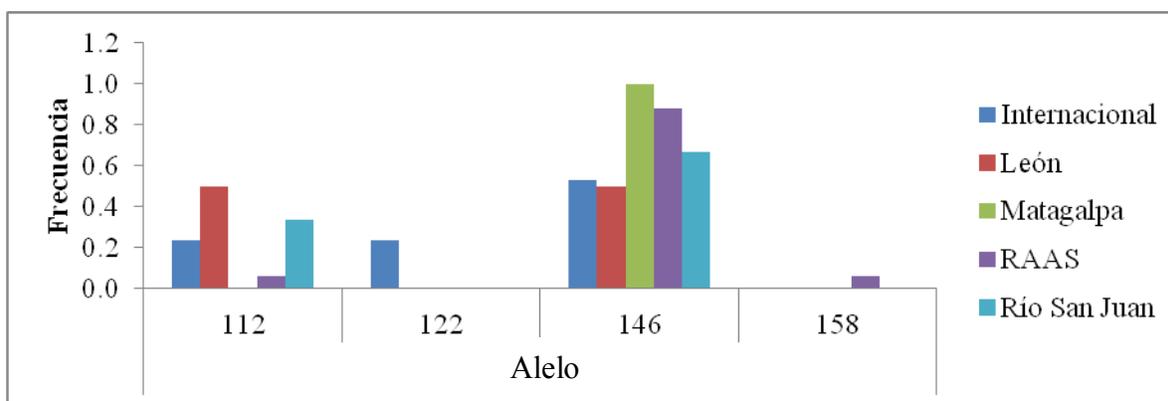
**Figura 10.** Frecuencia alélica locus SSRY-100.

La Figura 10 muestra que el locus SSRY-100 encontró frecuencia de ocho alelos, encontrando que el alelo 236 estuvo frecuente en los cinco grupos estudiados, presentando alta frecuencia para los grupos León y Matagalpa, siendo menos frecuente para el grupo de Río San Juan; mientras que los alelos 218, 254 y 272 se encontraron frecuentes en cuatro de los grupos, los grupos de Matagalpa y León presentaron el menor número de alelos frecuentes, mientras que los grupos de las accesiones Internacionales, RAAS y Río San Juan mostraron mayor número de alelos frecuentes.



**Figura 11.** Frecuencia alélica locus GA-131.

La Figura 11 muestra que el locus GA-131 encontró nueve alelos frecuentes, siendo este el locus que identificó mayor número de alelos frecuentes, los alelos 130 y 140 estuvieron frecuentes en los cinco grupos, mostrando mayor frecuencia el alelo 130 en el grupo de Matagalpa, mientras que el alelo 140 mostró mayor frecuencia en el grupo de Río San Juan. De los nueve alelos siete manifestaron frecuencia en el grupo de la RAAS, no así en el grupo de Matagalpa que solo presentó tres alelos frecuentes, mostrándose el alelo 90 solo para este grupo.



**Figura 12.** Frecuencia alélica locus GA-21.

La Figura 12 muestra que el locus GA-21 encontró frecuencia alélica de cuatro alelos, donde el alelo 146 estuvo frecuente en los cinco grupos, los alelos 112 y 146 estuvieron frecuentes en las accesiones de León, los grupos con mayores alelos frecuentes fueron los de las accesiones de la RAAS e Internacionales. Los alelos 112 y 158 mostraron baja frecuencia para el grupo de la RAAS.

## 4.2 Estructura genética

### *Análisis molecular de varianza (AMOVA)*

El AMOVA se ha utilizado para hallar las diferencias de varianzas entre y dentro del grupo (Tabla 5). Considerando los datos generados por los 9 SSR analizados, se han detectado dentro de los grupos una total variación (100%). Los datos obtenidos en este estudio, muestran que las diferencias existen dentro de los grupos no mostrando diferencias entre los diferentes grupos que representan distintos sitios de colecta, estos datos resultaron no similares a los encontrados por Alzate 2009, encontrando baja variabilidad entre grupos, y una alta variabilidad dentro de los grupos.

**Cuadro 5.** Análisis molecular de varianza

| Fuentes          | GL | SC      | CM     | Var. Est. | % de Variación |
|------------------|----|---------|--------|-----------|----------------|
| Entre Grupos     | 4  | 41.029  | 10.257 | 0.966     | 0.0            |
| Dentro de grupos | 47 | 522.029 | 11.107 | 11.107    | 100            |
| Total            | 51 | 563.058 |        | 11.107    | 100            |

Grados de libertad (GL), suma de cuadrados (SC), cuadrado medio (CM), Variación Estándar (Var. Est.), porcentaje de variación (% de Variación).

### *Distancia e identidad genética*

La mayor distancia genética existe entre el grupo de las accesiones de Matagalpa versus el grupo de las accesiones Internacionales con 0.2165 (Tabla 6), esto probablemente se deba a que las accesiones Internacionales no están relacionados con las accesiones existentes en Matagalpa, debido principalmente a que este departamento está ubicado en el centro del país, por tanto las probabilidades de que se hayan difundido accesiones a esta región son mínimas, mientras que la difusión de materiales en el resto de los departamentos es mayormente posible debido a la existencia de programas de innovación, transferencias, mejoramiento genético de la yuca y otros cultivos destinados para el consumo y para la exportación, implementados por organizaciones gubernamentales y no gubernamentales. La menor distancia genética existe entre el grupo de Río San Juan versus el grupo de la RAAS con valor de 0.0859, esto demuestra que las accesiones de estos dos departamentos están muy relacionados entre sí, probablemente debido a que son vecinos, lo que facilita el intercambio de materiales vegetativos entre pequeños agricultores de la zona. La menor identidad genética se expresó en el grupo de las accesiones Internacionales versus el grupo de Matagalpa con valor de 0.8054, comprobando que a menor identidad existe mayor distancia genética entre el grupo comparado. El grupo con mayor identidad genética fue el de Río San Juan versus el grupo de la RAA con valor de 0.9177 (Tabla 6), igual podemos asegurar que a mayor identidad genética menor distancia genética.

**Cuadro 6.** Distancia e identidad genética de Neis (1973) en cinco grupos de yuca

| <b>ID</b>       | <b>Internacionales</b> | <b>León</b> | <b>Matagalpa</b> | <b>RAAS</b>   | <b>Rio San Juan</b> |
|-----------------|------------------------|-------------|------------------|---------------|---------------------|
| Internacionales | ****                   | 0.8114      | <b>0.8054</b>    | 0.8999        | 0.9161              |
| León            | 0.2089                 | ****        | 0.8202           | 0.8148        | 0.8081              |
| Matagalpa       | <b>0.2165</b>          | 0.1983      | ****             | 0.8818        | 0.8510              |
| RAAS            | 0.1054                 | 0.2048      | 0.1258           | ****          | <b>0.9177</b>       |
| Rio San Juan    | 0.0876                 | 0.2131      | 0.1613           | <b>0.0859</b> | ****                |

\*datos encima de la diagonal corresponden a identidad genética y por debajo de la diagonal a la distancia genética.

### *Análisis de conglomerado*

La Figura 5 representa las relaciones y distancias genéticas existentes entre las 52 accesiones analizadas. Este análisis identificó dos grupos principales con grados de similitud en rangos comprendidos entre 0.24 a 0.72, evidenciando alta diversidad genética, el coeficiente de correlación cofenética fue de 0.82 %, encontrándose dentro de los rangos citados por (Zambrano, 2002), en su estudio de diversidad genética de una colección de yuca a través de marcadores moleculares, quien considera que un buen coeficiente de correlación cofenética tiene valores comprendidos entre 0.8 y 0.9 %.

En el primer grupo se identificaron seis subgrupos, donde la accesión Internacional BGNY023 (CR-31 de Colombia), mostró ser diferente al resto de las accesiones del primer grupo, estando correlacionada a una distancia menor a 0.72.

Las accesiones nacionales BGNY037 (RPL-006Y de Laguna de Perlas) y BGN024 (Cuapa de RAAS) mostraron ser similares, pero no idénticas entre si y correlacionadas a la accesión BGNY023.

Las accesiones Internacionales BGNY046 (Jari de Brasil) y BGNY021 (CM-773 de Colombia) resultaron ser genéticamente idénticas a la accesión nacional BGNY012 (Ceiba de León), estas tres accesiones correlacionadas a una distancia mayor a 0.48.

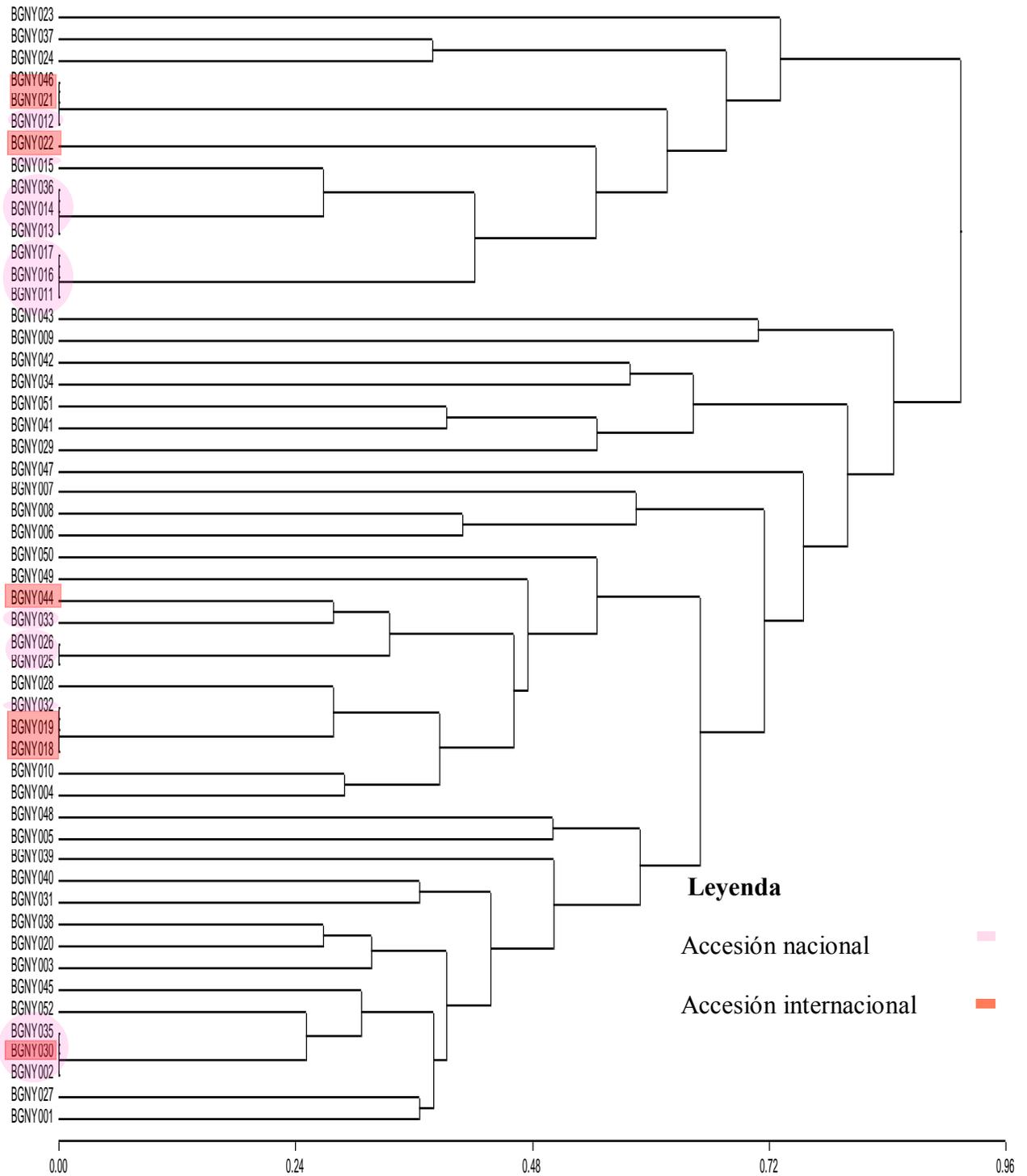
Las accesiones nacionales BGNY036 (RPL-04Y de la RAAS), BGNY014 (Chalmeca 1 de Rio San Juan) y BGNY013 (Chacaraseca de León), resultaron ser idénticas entre ellas y similares a la accesión nacional BGNY015 con distancia genética mayor a 0.24; a la vez esas accesiones presentaron similitud a las accesiones internacionales BGNY017 (CM 2772), BGNY016 (CM6119-7) ambas de Colombia y a la accesión nacional BGNY 011 (Castillo de Rio San Juan) estas tres idénticas entre sí.

En el segundo grupo se identificó que las accesiones nacionales BGNY026 (Jerusalen de Rio San Juan), BGNY025 (Isabel de León) son idénticas entre si y similares a la accesión nacional BGNY033 (Quintalera de RAA) y a la accesión Internacional BGNY044 (Dorada de Brasil).

La accesión nacional BGNY032 (Quelite de RAAS) resultó ser idéntica a las accesiones internacionales BGNY019 (CM-6740-7) y BGNY018 (CM-523-7) ambas de Colombia. Las accesiones nacionales BGNY035 (RPL-003Y de la RAAS) y BGNY002 (Arbolito de la RAAS) resultaron ser idénticas a la accesión internacional BGNY030, ambas similares a la accesión nacional BGNY052 (BL Tex-0012Y de la RAAS) con distancia genética mayor a 0.24.

El resto de las accesiones mostraron ser similares pero no idénticas con distancia genéticas comprendidas entre 0.24 y 0.72 de similitud.

Los resultados de este estudio mostraron variable de similitud de Jaccard desde 0.24 a 0.72 el cual está en rangos encontrados en el estudio realizado por Siqueira *et al.*, 2009. Quienes evaluaron 49 variedades locales de yuca en el Brasil, el cual se llevó a cabo con el método UPAGMA y el coeficiente de Jaccard, mostrando una alta variabilidad genética para las especies autóctonas con un rango de similitud entre 0.19 a 0.83.



**Figura 13.** Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud de Jaccard.

## V. CONCLUSIONES

Existe diversidad genética en las accesiones de yuca cultivados en el banco de germoplasma del CNIAB-INTA, debido a la naturaleza heterocigota del cultivo.

El grupo de las accesiones de Matagalpa presentó mayor distancia genética con el grupo de las accesiones Internacionales, debido a que la zona de Matagalpa está menos propensa a la introducción de materiales por falta de programas de mejora en el cultivo de Matagalpa, mientras que las accesiones de los grupos de la RAAS y Rio San Juan son en primer lugar las de mayor producción a nivel nacional; por tanto demandan material altamente productivo, al igual son zonas fronterizas con Costa Rica lo que facilita la introducción de material.

Existe duplicidad en el banco de germoplasma del CNIAB- INTA. Se detectaron seis grupos molecularmente iguales, formados por las accesiones Internacionales BGNY046, BGNY021 y la accesión nacional BGNY012. Las accesiones nacionales BGNY014, BGNY013 y BGNY036. Las accesiones internacionales BGNY017 y BGN 016 y la accesión nacional BGNY011. Las accesiones nacionales BGNY026 y BGNY025. Las accesiones internacionales BGNY019 y BGNY018 con la accesión nacional BGNY032, y las accesiones nacionales BGNY035 y BGNY002 con la accesión internacional BGNY 030.

## VI. RECOMENDACIONES

En el banco de germoplasma del CNIAB-INTA es necesario seleccionar una de las accesiones que resultaron ser idénticas en el presente estudio, ya que mantener y manejar bancos de germoplasma con accesiones repetidas en nuestras condiciones económicas resulta muy costoso.

Los marcadores GA-12, GA-131 y el SSRY-100 pueden ser recomendados para futuras investigaciones de diversidad genética, ya que mostraron mejores resultados en cuanto a los datos de identificación de alelos y las frecuencias alélicas.

Estandarizar el número de muestras por grupo, para obtener uniformidad en el análisis de los datos.

En futuras investigaciones en vez de usar 9 microsatélites, utilizar 18, por que la yuca posee 18 pares de cromosomas y según (Ceballos 2003), es recomendable utilizar un microsatélite por cromosoma, logrando mayor la información.

Priorizar para futuras investigaciones de mejora genética los materiales que revelaron ser diferentes al resto del material evaluado, usando marcadores específicos ya que estas accesiones podrían estar relacionadas a altos contenidos de  $\beta$ -caroteno, resistentes a plagas y enfermedades.

## VII. LITERATURA CITADA

Alzate, A. 2009. Variabilidad genética y grado de adopción de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz). cultivada por pequeños agricultores de la Costa Atlántica Colombiana. Tesis. MSc. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, CO. 86 p

Beovides, y.; Fregene, M.; Alves, A.; Gutiérrez, J.; Buitrago, Ch.; Marin, A.J.; Milián, M. D.; Rodríguez, J. A.; Guerra, D.; Toledo<sup>1</sup>, H.; Roca, O.; Albert, J.; García, J.; Oliva, M. 2006. Análisis de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) en cultivares del germoplasma cubano de yuca. Biotecnología Vegetal Vol. 6, No. 1: 9 – 14.

Casalla, R. 2003. Medición de la distancia genética en grupos de camarón blanco *Liptopenaeus Vannamei* en la costa ecuatoriana. Tesis. MSc. Escuela Superior Politécnica del litoral, facultad de ingeniería marítima y ciencias del mar. Guayaquil. EC. 83 p.

Ceballos, H. 2000. La yuca en Colombia y el mundo: Nuevas Perspectivas para un cultivo milenario. (En línea). Cali Colombia. Publicación CIAT; no.327. Consultado 11 febrero, 2011. Disponible en [www.clayuca.org/PDF/libro\\_yuca/capitulo01.pdf](http://www.clayuca.org/PDF/libro_yuca/capitulo01.pdf)

Ceballos, H.; De la Cruz, G. 2003a. La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción procesamiento, utilización y comercialización. Mejoramiento y tecnificación. (En línea). Cali Colombia. Publicación CIAT; no.327. Consultado 04 marzo, 2011. Disponible en <http://www.clayuca.org/contenido.htm>

Ceballos, H.; De la Cruz, G. 2003b. La yuca en el tercer milenio: Sistemas modernos de producción procesamiento, utilización y comercialización. Taxonomía y morfología de la yuca. (En línea).Cali Colombia. Publicación CIAT; no.327. Consultado 03 marzo, 2011. Disponible en <http://www.clayuca.org/contenido.htm>

Ceballos, H.; Sánchez, T.; Chávez, A.L.; Iglesias F., C.A.; Debouck, D.G.; Mafla B., G.; Tohme M., J. 2006. Variation in crude protein content in cassava (*Manihot esculenta* Crantz) roots. Journal of Food Composition y Analysis 19:589-593.

Chavarriga-Aguirre P, Maya M M, Bonierbale M W, Kresivich S, Fregene M A, Tohme J y Kochert G. 1998 Microsatellites in cassava (*Manihot esculenta* Crantz): Discovery, inheritance and variability. Theor Appl Genet 97:493-501.

Demey, J. 2003. Relación entre caracterizaciones molecular y morfológica en una colección de yuca. Interciencia. Vol.28 (012). Caracas, Venezuela.pp. 6844-689.

Di Betetti, M.S. 2000. The distribution of grooming among female primates: testing hypotheses with Shannon-Wiener diversity index. Behaviour 137 (11): 1517-1540.

Dixon, A. 2002. Simple sequence repeat SSR marker diversity in cassava *Manihot esculenta* Crantz landraces from Nigeria. Annual Report: Development and use of biotechnology tools for cassava improvement. CIAT. Cali. Annual Report: Output 8-43.

Domínguez, C. 1982. Yuca: Investigación, producción y utilización. CIAT, PNUD.

Elías M, Mühlen G S, McKey D, Roa AC y Thome J 2004 Genetic diversity of traditional south American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz): An analysis using microsatellites. *Econ Bot* 58:242-256.

Excoffier, L. G. Laval, y S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

FAO (Organización de las naciones unidas para la alimentación y la agricultura), 2010. Perspectivas alimentarias, análisis de los mercados mundiales.

Henry G, Westby A, Collison C. 1998. Global Cassava end uses and markets: Current situation and recommendations for further study, (en línea). Consultado 13 de marzo. 2012. Disponible en [www.globalcassavastrategy.com](http://www.globalcassavastrategy.com).

INTA. 2010. INTA desarrolla nuevas variedades de semillas de yuca, (en línea). Consultado 24 febrero. 2011. Disponible en [http://www.el19diglal.com/index.php?..inta\\_yuca](http://www.el19diglal.com/index.php?..inta_yuca).

MAGFOR (Ministerio agropecuario y forestal), 2011. Informe de producción agropecuaria.

IICA (Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura), 2004. Cadena agroindustrial de la yuca. (En línea), consultado 17 de marzo, 2011. Nicaragua. Disponible en [http://www.iica.int.ni/EstudiosPDF/cadenasAgroindustriales/Cadena\\_Yuca.pdf](http://www.iica.int.ni/EstudiosPDF/cadenasAgroindustriales/Cadena_Yuca.pdf)

Morrillo, A. 2009a. Mapeo de regiones del genoma asociadas con el contenido de  $\beta$ -caroteno en yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis. Dr. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agrarias. Palmira, CO. 254 p.

Morrillo, Y. 2009b. Herencia del contenido de carotenos en raíces de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Tesis. *M Sc.* Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias. Palmira, CO .225 p.

Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc natl acad scin USA* 70:3321-3323.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetic* 83:583-590.

Peakall, R., Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Siqueira, M.; Jurema, R.; Queiroz, E.; Borges, B.; Kayo, J.; y Pereira, J. Genetic characterization of cassava (*Manihot esculenta*) landraces in Brazil assessed with simple sequence repeats. 2009, (en línea). Consultado 22 Marzo. 2011. Disponible en [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1415-47572009000100015&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s1415-47572009000100015&script=sci_arttext).

Holsinger, K. S.f. Tamaño efectivo de una población. [www.uam.es/personal\\_pd/ciencias/.../tamagno\\_efectivo.htm](http://www.uam.es/personal_pd/ciencias/.../tamagno_efectivo.htm).

Yeh, F.C. y T.J.B. Boyle 1997. POPGENE V.3.2. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.

Weir, B.; Cockerham, C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

Wilches, A. 2004. Descripción de las herramientas moleculares y sus aplicaciones en la agricultura. Guatemala. Instituto de agricultura, recursos naturales y ambiente de la URL. Serie No. 15. 25 p. (En línea). Nicaragua, Consultado 08 marzo 2011. Disponible en <http://www.elpueblopresidente.com/AGROFORESTAL/6069.html>

Zaldivar, M.; Rocha, O. 2006. Diversidad genética y variación en la viabilidad de plantas cultivadas en sistemas agrícolas. Proyecto de investigación de la escuela de biología. CR. 23 pág.

## VIII. ANEXOS

### Anexo 1. Abreviaturas

| <b>Siglas</b> | <b>Significado</b>  |
|---------------|---|
| ADN           | Acido desoxirribonucleico                                     |
| AMOVA         | Análisis Molecular de Varianza                                |
| CIAT          | Centro Internacional de Agricultura Tropical                  |
| CNIAB         | Centro Nacional de Investigación Agropecuaria y Biotecnología |
| CTAB          | Hexadecyltrimethylammoniumbromide                             |
| CIA           | Cloroformo Isomylalcohol                                      |
| dATP          | DesoxiAdenosinTrifosfato                                      |
| dGTP          | DesoxiGuanosinTrifosfato                                      |
| dCTP          | DesoxiCitodineTrifosfato                                      |
| dTTP          | DesoxiTriamidinTrifosfato                                     |
| EDTA          | Ethylenediaminetetracetic Ácido de Sodium Salt                |
| g             | Gramo (s)   |
| ISSR          | Repetición de Secuencia Intergénicas simple                   |
| M             | Mol (ar)  |
| mM            | Micro mol   |
| ml            | Mililitro   |
| Mq Water      | Agua Calidad PCR  |
| PCA           | Análisis de Componentes Principales                           |
| PCR           | Reacción en Cadena de la Polimerasa                           |
| PIC           | Contenido de Información Polimórfica                          |
| PVP           | Poli vinyl Pirrolidone  |
| RFLP          | Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción         |
| RAPD          | DNA polimórfico amplificado al azar                           |
| Rpm           | Revoluciones por minuto                                       |
| SSR           | Secuencia Simple de Repeticiones                              |
| TRIS          | HydraxymethylAmimomethenlHydrochloride                        |
| TBE           | Tris Ácido Bórico EDTA  |
| µl            | Microlitro  |

## Anexo 2. GLOSARIO

**ADN (Ácido desoxirribonucleico):** Base molecular de la herencia. Una molécula de ADN es un polímero de desoxinucleotidos ordenados en una doble hélice (dos hebras) de azúcares fosfatados con bases purinas y pirimidinas proyectados al centro. Cada hebra se mantiene unida por enlaces fosfodiéster entre los carbonos 3' y 5' de nucleótidos adyacentes.

**ADN Genómico:** ADN que incluye todas las secuencias de nucleótidos contenida en el genoma de un individuo. Término utilizado para referirse al ADN extraído mediante el uso de solventes (fenol) y detergentes (CTAB).

**Agarosa:** Polisacárido formado por galactosa alfa y beta que se extraen de las algas de los géneros *Gellidium* y *Gracillaria*. La agarosa es un producto natural que forma una matriz inerte y no tóxica que supone una herramienta indispensable en gran cantidad de técnicas de biología molecular, bioquímica y biología celular. Su uso más extendido es para construir geles que permitan separar moléculas de ADN mediante electroforesis.

**Alelo:** Cada una de las formas posibles de un gen.

**Alelos efectivos:** Número de alelos igualmente frecuentes en un grupo.

**Alineamiento de iniciadores:** Etapa de la PCR inmediatamente después de la desnaturalización, en la cual se baja la temperatura para permitir que los dos iniciadores se unan a las frecuencias flaqueantes del ADN por amplificar en cada una de las hebras.

**Amplificación:** Creación de numerosas copias de un segmento de ADN mediante PCR. Multiplicación repetida de una secuencia concreta de ADN.

**Bromuro de etidio:** Análogo de bases que se intercala en forma irreversible entre las bases de las moléculas de ADN. Cuando se le excita con la luz ultravioleta emite fluorescencia de color naranja. Para teñir ADN en las geles es fluorescente cuando se le expone a la luz ultravioleta.

**Cebador:** Fragmentos cortos de ADN, monohebra de 10-20 bases, de secuencia aleatoria o arbitraria. Los cebadores se hibridan en aquellos sitios donde encuentran secuencias complementarias en el ADN usado como molde.

**Centrifugar:** separación de las moléculas por tamaño o densidad mediante fuerzas centrifugas por el giro de un rotor.

**Clon:** Grupo de células o de organismos genéticamente idénticos a partir de una misma célula u organismo por reproducción asexual. Grupo de plantas genéticamente idénticas obtenidas todas ellas por propagación vegetativa de un individuo seleccionado.

**Cromosoma:** En las células eucariotas son los cuerpos nucleares que contienen la mayoría de los genes responsables en gran parte de la diferenciación y actividad celular.

**Desnaturalización del ADN:** Separación de las dos hebras que constituyen al ADN por rompimiento de los enlaces de hidrogeno entre bases complementarias. El ADN se desnatura a temperaturas superiores a 90 °C. Primera etapa de la PCR.

**dNTPs (desoxinucleotidos):** Nucleótidos cuya pentosa es una desoxirribosa y por ende son los monómeros del ácido desoxirribonucleico.

**Extensión del ADN:** Tercera etapa en la PCR. La temperatura es elevada a 72 °C para permitir que una ADN *polimerasa* inicie la síntesis a partir del iniciador agregando *dNTPs* libres sobre la hebra que sirve de templado.

**Frecuencia alélica:** Proporción que se observa de un alelo específico respecto al conjunto de los que pueden ocupar un locus determinado en la población.

**Gen:** Unidad hereditaria que contiene información genética (ADN) que es transcrita a ARN y traducida a una cadena polipeptídica (proteína). En el genoma de un organismo, una secuencia de nucleótidos a la que se le puede asignar una función específica.

**Genoma:** Término utilizado para referirse a todos los genes (información genética) contenida en un solo gameto, es decir un representante de cada cromosoma.

**Genotipo:** Constitución genética de un organismo, que estará dada por la información heredada por ambos padres. Específicamente para un solo locus, el genotipo estará dado por los alelos heredados por ambos padres.

**Población:** Individuos de la misma especie que habitan una determinada área geográfica y que por ende se entrecruzan y comparten un acervo común de genes.

**Heterocigoto:** Individuos con alelos no idénticos para un determinado gen o genes. La condición se denomina heterocigosis.

**Heterocigosidad:** Frecuencia media de individuos heterocigóticos para un locus o en promedio para varios locis. Es un estimador de la variabilidad genética en poblaciones naturales o domesticadas.

**Iniciador (del inglés primer):** Oligonucleotido (Alrededor de 20pb) de una sola hebra que se alinea (homologa) para iniciar la replicación del ADN mediante una polimerasa. Se requieren dos iniciadores (uno para cada hebra de ADN), los cuales flanquearan la región por amplificar.

**Monomorfismo:** En un grupo ausencia de variación en un marcador, gen, cromosoma o carácter determinado genéticamente.

**Microsatélite:** Pequeña secuencia entre dos y ocho nucleótidos que se repiten en tandes al azar a lo largo del genoma, en donde el número de repeticiones revela diferencias genéticas entre los individuos. Estos pueden ser dinucleótidos, trinucleotidos y tetranucleótidos.

**Marcador Molecular:** Genes, proteínas o fragmentos de ADN polimórficos que permiten distinguir entre individuos, familias, grupos o especies.

**Monómero:** Molécula pequeña (aminoácidos, nucleótidos) que pueden combinarse con otras idénticas o similares para formar un molécula más grande y compleja llamada polimerasa.

**Nucleótido:** Nucleosido (Base (purina o pirimidina) unida de forma covalente a un azúcar pentosa con uno o más grupos fosfatos unidos al hidroxilo 3' o 5' de una pentosa).

**Número de alelos:** Estimador de la variabilidad genética en grupos, se determina para cada muestra poblacional.

**Polimorfismo:** Variación alélica en un locus.

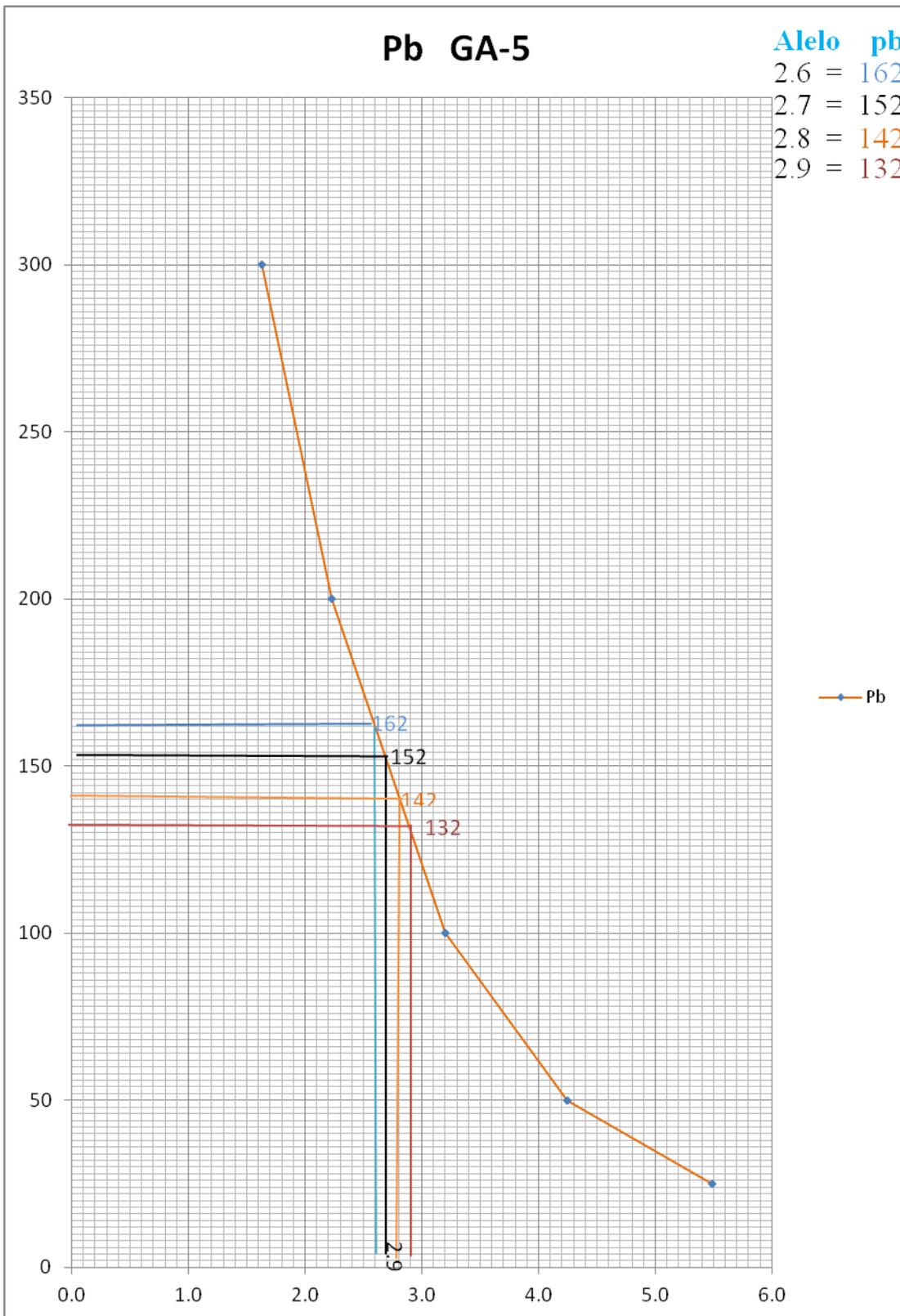
**Polimerasa:** Enzima que cataliza la formación de polímeros a partir de un monómero. Un ADN polimerasa sintetiza ADN a partir de desoxinucleotidos trifosfato utilizando una hebra complementaria de ADN y cebador.

**Polimerasa Taq:** ADN polimerasa termo estable aislada de la bacteria termofílica *Thermus aquaticus*, muy utilizada en PCR.

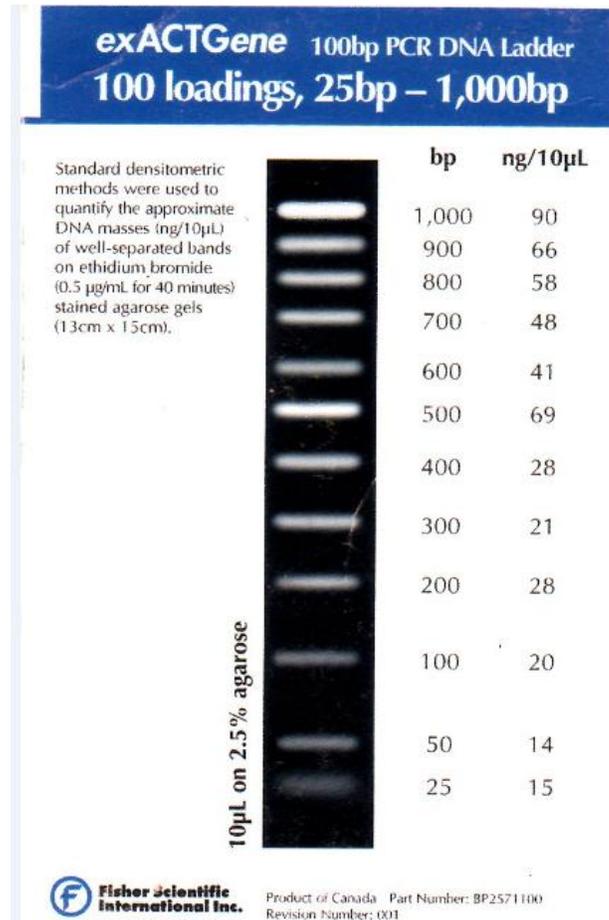
**PCR (del inglés polymerase Chain Reaction) Reacción en la cadena de la polimerasa:** Técnica con la que se copian las hebras complementarias de una molécula de ADN blanco simultáneamente a través de una serie de ciclos, que incluyen una desnaturalización del ADN, alineamiento de iniciadores y extensión (Síntesis) mediante una polimerasa (comúnmente *Taq polimerasa*).

**Secuenciación:** Establecimiento del orden de las bases nucleotídicas (Secuencia) de 5' a 3' en un fragmento de ADN de interés.

**Anexo 3.** Gráfica logarítmica para obtener el tamaño de las bandas



#### Anexo 4. Regla de ADN de 25 a 1000 pb



## Anexo 5. Gradiente de temperatura para el anillamiento

Para la selección de temperaturas óptimas durante el anillamiento se procedió a realizar la siguiente gradiente de temperatura, de la cual se seleccionó la temperatura que identificara la mejor intensidad de banda.

| Temperaturas | Marcador                         |
|--------------|----------------------------------|
| 1. 45 °C     |                                  |
| 2. 45.3 °C   |                                  |
| 3. 46.4 °C   |                                  |
| 4. 48.2 °C   | GA-21,GA-140, SSRY 100, SSRY 242 |
| 5. 50.4 °C   | GA-5,GA-12, GA-134               |
| 6. 53 °C     | GA-126, GA-131                   |
| 7. 55.8 °C   |                                  |
| 8. 58.5 °C   |                                  |
| 9. 61 °C     |                                  |
| 10. 63.1 °C  |                                  |
| 11. 64.7 °C  |                                  |
| 12. 65 °C    |                                  |

■ Temperaturas seleccionadas para correr PCR

## Anexo 6. Preparación de soluciones que se usaron en la extracción de ADN

### 6.1 Buffer CTAB

| Reactivos                   | Cantidad |
|-----------------------------|----------|
| CTAB                        | 2g       |
| ddH <sub>2</sub> O          | 90ml     |
| 1M, Tris                    | 5ml      |
| 5M, NaCL                    | 1ml      |
| 0.5M, EDTA                  | 4ml      |
| Polivinyl Pirrolidone (PVP) | 1g       |

El volumen que se preparó fue de 100 ml. Todos los reactivos se disuelven y se rellenan de agua destilada hasta alcanzar un volumen de 100 ml. Llevar a autoclave.

### 6.2 Cloroformo Isopentyl alcohol CIA 24:1

| Reactivos     | Cantidad |
|---------------|----------|
| Cloroformo    | 48ml     |
| Isomylalcohol | 2ml      |

Esta concentración es para preparar 50ml.

### 6.3 Tris 1 Molar

| Reactivos                                | Cantidad |
|--|----------|
| Hidroxymethyl Aminomethenl Hydrochloride | 78.8g    |
| H <sub>2</sub> O destilada               | 300ml    |

Agregar HCL para fijar el pH a 8, la aplicación es variable, el volumen hay que completarlo hasta llegar a los 500mL.

### 6.4 BUFFER EDTA (Ethylenediaminetetracetic Acido Dissodium Saltdiol) 0.5 Mol.

| Reactivos  | Cantidad |
|--|----------|
| Ethylenediaminetetracetic Acido Dissodium Saltdiol | 186.12g  |
| H <sub>2</sub> O destilada                         | 750ml    |

La solución se debe rellenar con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 1 litro. Llevar a autoclave.

### 6.5 Cloruro de Sodio 5 Mol

| Reactivos                  | Cantidad |
|----------------------------|----------|
| NaCL                       | 146.1g   |
| H <sub>2</sub> O destilada | 350ml    |

La solución se debe rellenar con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 500ml. Llevar a autoclave.

### 6.6 Acetato de Sodio 3 Mol

| Reactivos                  | Cantidad |
|----------------------------|----------|
| Acetato de Sodio           | 204.12g  |
| H <sub>2</sub> O destilada | 350ml    |

La solución se rellenó con agua destilada hasta alcanzar el volumen de 500ml. Llevar a autoclave. Agregar de forma variable HCL hasta llegar al pH deseado de 5.2.

### 6.7 Solución madre TBE 10X

| Reactivos    | Cantidad |
|--------------|----------|
| EDTA         | 9.3g     |
| Ácido Bórico | 55g      |
| Tris Base    | 108g     |

Diluir en 1000ml de agua esterilizada. Para llevar la solución al 1X, del Stock original mezclar 100ml con 900ml de agua esterilizada.

## 6.8 BUFFER TE

| Reactivos         | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Tris HCL          | 10mM     |
| EDTA              | 0.1mM    |
| RNA <sub>SC</sub> | 4µl      |

## 6.9 Gel de agarosa metaphor

Para la preparación de 200ml al 4% se utilizaron los siguientes reactivos.

| Reactivos         | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Agarosa Metaphor  | 8g       |
| TBE 1X            | 200ml    |
| Bromuro de Etidio | 8.33 µl  |

Preparación: En un beker dejar calentar durante seis minutos el TBE 1X y agregar el agarosa Metaphor, dejándola un tiempo de ebullición de 28min, luego depositar la mezcla en carcasas con capacidad de 200 ml, introducir 2 peinetas de 20 espaciadores de 1mm, dejar solidificar la mezcla durante 30 min. Esta gel fue usada para correr ADN producto PCR.

## 6.10 Gel de agarosa simple

Para la preparación de 180ml al 1% se utilizaron los siguientes reactivos.

| Reactivos         | Cantidad |
|-------------------|----------|
| Agarosa           | 7.2g     |
| TBE 1X            | 180ml    |
| Bromuro de Etidio | 7.5 µl   |

Para la preparación de la gel, en un beker de 500 ml se vertió el TBE 1X y se dejó calentar durante seis minutos, luego se le agrego el agarosa y se dejó ebulir durante doce minutos hasta que la mezcla alcanzo una coloración transparente, luego se añade el bromuro de etidio se agita para homogenizar la mezcla y se vierte en la carcasa y se deja reposar hasta que se solidifique. Este gel se usó para verificar la presencia de ADN.

