

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Guadua  
angustifolia* Kunth EN EL EJE CAFETERO COLOMBIANO**

**ANDRES MAURICIO POSSO TERRANOVA**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2011**

**DIVERSIDAD GENÉTICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Guadua  
angustifolia* Kunth EN EL EJE CAFETERO COLOMBIANO**

**ANDRES MAURICIO POSSO TERRANOVA**

**Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con  
énfasis en Fitomejoramiento**

**DIRIGIDO POR:**

**JAIME EDUARDO MUÑOZ  
I. A. Esp. Ph.D**

**NANCY BARRERA MARIN  
Bióloga M.Sc. Ph.D**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS  
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADOS  
PALMIRA  
2011**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

SEDE PALMIRA

FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

ACTA DE JURADO DE TESIS

MAESTRÍA EN CIENCIAS AGRARIAS  
LINEA DE INVESTIGACIÓN FITOMEJORAMIENTO

En Palmira a los 23 días del mes de septiembre de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores Inés Sánchez y John A. Ocampo,

Para calificar la Tesis de Grado de:

**ANDRES MAURICIO POSSO TERRANOVA**

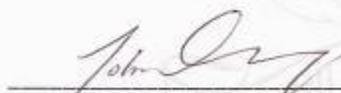
Titulada:

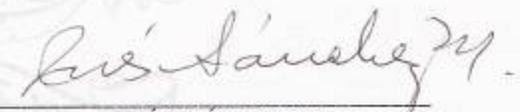
“DIVERSIDAD GENETICA Y ESTRUCTURA POBLACIONAL DE *Guadua angustifolia* Kunth EN EL EJE CAFETERO COLOMBIANO” bajo la dirección de Jaime Eduardo Muñoz Flórez, Ph.D., y Nancy Barrera Marín Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores INÉS SÁNCHEZ Y JOHN A. OCAMPO, y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADA

REPROBADA

  
\_\_\_\_\_  
JOHN A. OCAMPO

  
\_\_\_\_\_  
INÉS SÁNCHEZ

## DEDICATORIA

Hoy quisiera iniciar con las palabras que finalicé mi trabajo anterior:

“Para terminar – Y sin restar importancia- , quiero dedicar este trabajo a lo intangible, a lo que no puedo explicar mediante el método científico, a lo que dejamos atrás en Evolución, a la Unicidad, a lo que me brinda tranquilidad cuando la necesito y me ayuda a ser mejor persona. Me alejé y estuve del otro lado, ahora busco el equilibrio:

**A Dios, Alá, Jehová, Ra,... como le quieran llamar”.**

A mis Padres, amigos y compinches: Noralba y Manuel José. Soy biológicamente casi 50% de cada uno, soy la fusión perfecta de tan grandes personas. A pesar de todos mis errores, lo mejor de mí, es lo mejor de Ellos.

A mis Hijos Maria José y Andrés Mauricio. Algún día sabrán que durante la carrera, el posgrado y los momentos más adversos en mi vida, Ustedes fueron mi felicidad, mi salida y motivo para seguir adelante.

A José Manuel, simplemente por ser mi hermano, porque siempre, siempre está ahí cuando lo necesito. A Javi y Vicky, mis otros dos octavos...

Para terminar, quiero dedicar este trabajo a la mujer que me acompaña: Mi esposa Martha Liliana. Muchas gracias por tu amor, comprensión, apoyo y compañía.

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar quiero expresar mis más sinceros agradecimientos a los Profesores Luz Angela Álvarez y Jaime Eduardo Muñoz por su apoyo incondicional en mis asuntos académicos, laborales y personales durante el desarrollo de mi pre y posgrado. La finalización exitosa de esta etapa de mi vida no hubiese sido posible sin su valiosa colaboración.

Al Grupo de Investigación en Diversidad Biológica de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de esta investigación.

A la Dra. Ximena Londoño de la Pava y al Profesor Heiber Cardenas Henao por su valiosa colaboración y asesoría en este trabajo. Sus aportes científicos, paciencia y calidad humana contribuyeron de manera significativa a la culminación de esta investigación.

A las Doctoras Paula Andrea Rugeles, Ana Cruz Morillo y Yacenia Morillo por su colaboración incondicional en el desarrollo del trabajo experimental.

A todos y cada uno de los estudiantes del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Sus constantes inquietudes me hicieron crecer a la fuerza.

Al Señor Luis Ferney Bonilla y Señora Martha Elena Betancur por su apoyo durante el desarrollo de este posgrado.

A mis padres, por apoyarme siempre en las decisiones que he tomado.

La facultad y los jurados de tesis no se harán responsables de las ideas emitidas por el autor.

Artículo 24, resolución 04 de 1974

## CONTENIDO

INTRODUCCIÓN .....	16
1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA .....	18
2. JUSTIFICACION .....	20
3. OBJETIVOS.....	21
3.1 Objetivo general.....	21
3.2 Objetivos específicos.....	21
4. MARCO REFERENCIAL .....	22
4.1 Descripción botánica .....	22
4.2 Origen y distribución .....	22
4.3 Propagación y producción .....	25
4.4 Usos .....	25
4.5 Marcadores moleculares .....	25
4.6 Diversidad genética .....	26
5. DISEÑO METODOLÓGICO.....	29
5.1 Material vegetal .....	29
5.2 Caracterización molecular .....	29
5.2.1 Evaluación de cantidad y calidad de ADN .....	29
5.2.2 Marcadores moleculares Microsatélites.....	30
5.3 Análisis de la información .....	31
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	37
6.1 Material vegetal y banco de ADN .....	37
6.2 Amplificación por PCR de marcadores moleculares microsatélites .....	39

6.3	Visualización de productos amplificados .....	42
6.4	Características de los marcadores utilizados .....	43
6.4.1	Prueba de neutralidad.....	45
6.4.2	Equilibrio Hardy-Weinberg (HW).....	46
6.4.3	Desequilibrio de ligamiento (D).....	48
6.4.4	Contenido de información polimórfica (PIC) .....	49
6.4.5	Poder discriminante (Pd) .....	50
6.5	Análisis descriptivo .....	51
6.5.1	Análisis de correspondencia múltiple (ACM) .....	54
6.5.2	Índices de diversidad genética: heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos.....	55
6.5.3	Consanguinidad (F) .....	59
6.6	Diferenciación de las poblaciones .....	60
6.6.1	Fst.....	61
6.6.2	Fis.....	63
6.6.3	Fit.....	65
6.7	Distancia genética .....	65
6.8	Análisis de varianza molecular AMOVA .....	67
6.9	Tasa de reproducción cruzada (t).....	68
6.10	Flujo genético entre las poblaciones.....	71
7.	CONCLUSIONES .....	73
8.	RECOMENDACIONES .....	74
	BIBLIOGRAFÍA.....	75
	ANEXOS.....	81

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Morfología de la especie <i>Guadua angustifolia</i> .....	23
Figura 2. Mapa de distribución potencial de <i>Guadua angustifolia</i> .....	24
Figura 3. Variedades botánicas de la guadua: <i>G. angustifolia</i> var <i>angustifolia</i> , <i>G. angustifolia</i> var. <i>Bicolor</i> y <i>G. angustifolia</i> var <i>nigra</i> .....	27
Figura 4. Diagrama resumido de la metodología utilizada en el proyecto.....	36
Figura 5. Mapa de la distribución geográfica de los materiales utilizados en este estudio. ....	37
Figura 6. ADN de materiales del banco establecido y cuantificación mediante comparaciones con patrones de ADN de Lambda.....	38
Figura 7. Productos amplificados por PCR de nueve marcadores microsatélites utilizados.....	40
Figura 8. Productos amplificados después de la utilización de BSA. Nótese la aparición de bandas inespecíficas en el marcador FJ476075 .....	41
Figura 9. Patrones de bandas obtenidos con el microsatélite FJ476075. Nótese la clara diferenciación de individuos homocigotos (izquierda) de heterocigotos (derecha) .....	42
Figura 10. Patrones de bandas obtenidos con el microsatélite FJ476076. Nótese los diferentes patrones de bandas (alelos) obtenidos.....	43
Figura 11. Dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA utilizando los datos de nueve marcadores microsatélites en 72 materiales de <i>G. angustifolia</i> .....	52
Figura 12. Análisis de correspondencia múltiple (ACM) para las muestras evaluadas y construido utilizando los datos obtenidos mediante nueve marcadores moleculares microsatélite. ....	54
Figura 13. Grupos genéticos formados y analizados mediante marcadores moleculares RAMs en 23 sitios del Eje Cafetero Colombiano (Rugeles 2011).....	56

Figura 14. Grupos formados para el análisis de diversidad genética y estructura poblacional de 69 materiales de *G. angustifolia*, basados en cercanía geográfica y soportado por un análisis discriminante mediante el programa SAS versión 9.11.64

Figura 15. Dendrograma para los cinco grupos evaluados y construido mediante el método UPGMA con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones usando el programa TFPGA.....66

Figura 16. Flor de *G. angustifolia*. Nótese los seis estambres que cuelgan por debajo de los estigmas plumosos.....70

## LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Datos de 23 sitios utilizados para el análisis molecular y datos geográficos disponibles.....	30
Tabla 2. Marcadores microsatélites utilizados para la caracterización molecular (Pérez-Galindo <i>et al.</i> 2009).....	31
Tabla 3. Condiciones de amplificación para los nueve marcadores microsatélites utilizados.....	39
Tabla 4. Rangos de tamaño y temperaturas de hibridación para los nueve marcadores microsatélites utilizados.....	41
Tabla 5. Valores de probabilidad de pérdida alélica (L) para alelos con bajas frecuencias en la población.....	44
Tabla 6. Número de alelos, frecuencia alélica mínima (Pa), probabilidad de alelos nulos (r) y número efectivo de alelos (ENA) estimado para los nueve marcadores microsatélites usados.....	45
Tabla 7. Prueba de neutralidad de Ewens-Watterson para los nueve marcadores microsatélites utilizados.....	46
Tabla 8. Resultados de la prueba de equilibrio HW para los 9 marcadores microsatélites evaluados.....	47
Tabla 9. Contenido de información polimórfica (PIC) estimado para los nueve marcadores microsatélite evaluados.....	49
Tabla 10. Número de alelos, poder discriminante (Pd) y probabilidad de identidad (I) obtenidos para los nueve marcadores microsatélites usados.....	50
Tabla 11. Grupos formados para el análisis de diversidad genética y estructura poblacional utilizando nueve marcadores moleculares microsatélites.....	56
Tabla 12. Valores de heterocigosidad esperada (He), heterocigosidad observada (Ho) y porcentaje de loci polimórficos (P) para 5 grupos formados y utilizando los datos obtenidos con nueve marcadores moleculares microsatélites.....	57
Tabla 13. Valores de Ho y He evaluados para toda la población y con cada uno de los marcadores microsatélites utilizados.....	58

Tabla 14. Valores obtenidos de consanguinidad (F) obtenidos por cada uno de los marcadores y su promedio. ....	59
Tabla 15. Valores de F para cada uno de los grupos evaluados y estimados a partir de los datos combinados de nueve marcadores microsatélites. ....	60
Tabla 16. Valores de Fit, Fst y Fis obtenidos para cada uno de los nueve marcadores microsatélites utilizados y valor total para la población evaluada. ....	61
Tabla 17. Escala de valores de Fst y grados de diferenciación propuestos por Wright 1978. ....	62
Tabla 18. Matriz combinada de probabilidades (p) para cada par de comparaciones obtenida mediante la prueba Exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995). ....	63
Tabla 19. Distancias genéticas obtenidas mediante el índice de Nei (1978) para los cinco grupos evaluados de <i>G. angustifolia</i> . ....	66
Tabla 20. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los cuatro grupos formados. ....	67
Tabla 21. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los cinco grupos formados y utilizando los datos obtenidos de nueve marcadores microsatélites. ....	68

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas con nueve marcadores moleculares microsatélites en 72 muestras de <i>Guadua angustifolia</i> .....	81
Anexo B. Base de datos con información de colecta de 90 materiales pertenecientes al banco de ADN. Cada sitio está representado por 3 materiales colectados.....	84
Anexo C. Salida de la prueba para desequilibrio de ligamiento (Slatkin 1994) usando el programa Arlequin versión 3.11 .....	85
Anexo D. Matriz de distancias geográficas (metros) para los 23 sitios evaluados provenientes del Eje Cafetero Colombiano calculada usando los datos de georeferencia y mediante el programa Diva-Gis 7.3.0.1 ( <a href="http://www.diva-gis.org">www.diva-gis.org</a> ). .....	89
Anexo E. Salida del análisis discriminante mediante el programa SAS versión 9.0 y realizado con los datos obtenidos de nueve marcadores microsatélites en 72 materiales de <i>G. angustifolia</i> .....	91
Anexo F. Prueba Exacta de diferenciación poblacional (Raymond and Rousset 1995) para 72 materiales de <i>G. angustifolia</i> , provenientes de 23 sitios del Eje Cafetero Colombiano y un sitio en Perú, distribuidos en 5 grupos formados y realizada mediante el programa TFPGA.....	95

## RESUMEN

La *Guadua angustifolia* es un bambú leñoso perteneciente a la familia Poaceae, es endémica de América y se considera como nativa de Colombia, Venezuela y Ecuador. El área de guaduales naturales y plantados durante los últimos 25 años en Colombia es de 51,000 ha, de las cuales 46,000 ha son naturales y 5,000 ha son cultivadas. Se ha registrado una diversidad de 100 especies de bambúes en 19 géneros, de las cuales 24 son endémicas. Es considerada como uno de los bambúes de América más apropiados para la fabricación de papel, para la construcción de muebles, objetos decorativos, instrumentos y edificaciones en bahareque. La guadua como recurso genético de la biodiversidad del trópico no ha sido suficientemente estudiada, la tala indiscriminada y la destrucción de guaduales sin plantear estrategias de resiembra y recuperación, inciden directamente en la pérdida de este recurso. El objetivo principal de este trabajo fue estudiar la diversidad genética de *Guadua angustifolia* y la estructura poblacional de guaduales en el eje cafetero colombiano usando marcadores moleculares microsatélites. La información de los patrones de bandas obtenidos permitió estimar parámetros de diversidad y estructura genética, mostrando alta diversidad genética ( $H_e=0.56$ ) y moderada diferenciación poblacional ( $F_{st}=0,098$ ) para los materiales colectados. Además, los resultados mostraron que posiblemente existe autoincompatibilidad genética en cruzamientos dada la alta presencia de individuos heterocigotos y un valor de heterocigosidad observada (0.71) mayor que la heterocigosidad esperada (0.56). Las pruebas de correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas, el análisis discriminante y los valores de distancia genética encontrados entre grupos no fueron evidencia suficiente para proponer que existe estructuración poblacional asociada a ubicaciones geográficas. El poder de discriminación combinado usando los nueve marcadores fue de 99.9995% indicando que los marcadores usados en este estudio son muy útiles para estudios de diversidad genética en guadua. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en este estudio, los grupos evaluados de *G. angustifolia* en el eje cafetero Colombiano podrían ser considerados una sola población con intercambio de información genética y la presencia de moderada estructuración poblacional a pesar del flujo genético existente puede ser explicada por algún proceso de selección que favorezca la prevalencia de un exceso de heterocigotos. Los resultados de esta investigación podrán ser utilizados para establecer estrategias de uso y manejo sostenible, además, para ser usados en futuros programas de conservación, selección y mejoramiento genético de la especie.

**Palabras clave:** microsatélites, ADN, bancos de germoplasma, biodiversidad.

## SUMMARY

The American giant bamboo *Guadua angustifolia* is a woody bamboo; it belongs to Poaceae family, is endemic from South America and is considered as a native resource from Colombia, Venezuela and Ecuador. The total area of plantations and natural forests in Colombia is about 51000 ha, from which 46000 ha are natural forests and 5000 as commercial crops. Colombia has a biodiversity in bamboos of 100 species in 19 genus, 24 as endemic species. The Giant bamboo is considered as excellent material for paper fabrication, furniture elaboration, decorative elements and ideal for home construction. As a genetic resource from Colombian tropical biodiversity, it has not been sufficiently studied; the uncontrolled use and destruction of natural forests without planning of recuperation strategies have lead to the lost of this resource. The main objective of this research was to study the genetic diversity and population structure of *Guadua angustifolia* in the Colombian coffee region using microsatélites molecular markers. The information obtained from the patterns of lines allowed us to estimate parameters of genetic diversity and population structure, showing a high genetic diversity ( $H_e=0.56$ ) and genetic structure ( $F_{st}= 0,098$ ) for the collected materials. Also, results indicated a possible auto incompatibility in crosses due the high presence of heterozygote individuals and an observed heterozygosis (0.71) higher than expected heterozygosis (0.56). Correlation test for genetic and geographical distances, discriminated analysis and genetic distances values among groups were not evidence to propose a population structure associated with geographical locations. The combined discrimination power using 9 microsatellites molecular markers was 99.9995% indicating that markers used in this study are very useful for genetic studies in Giant Bamboo. Due all the obtained results, evaluated groups of *G. angustifolia* in the Colombian coffee region could be considered as one single population with genetic flow and the presence of low population structure even with the presence of genetic flow could be explained for a selection process that favors the prevalence of an excess of heterozygote individuals. Results of this research will be used for a sustainable use and manage of the genetic resource and to be applied in further conservation, selection, and breeding programs.

**Key words:** microsatellites Molecular markers, DNA, Germplasm banks, Biodiversity

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la destrucción de los bosques del planeta, el calentamiento global y la dependencia de la población mundial de unas pocas especies de plantas, han llevado a la pérdida de diversidad genética. Esta situación ha alertado a la mayoría de los países del mundo y existe la necesidad de salvar esta diversidad natural. De allí que la exploración, recolección y manejo de la diversidad genética tenga gran importancia. El diagnóstico reciente sobre el estado de biodiversidad en Colombia indica que varios de los ecosistemas de montaña se encuentran seriamente amenazados con alto riesgo de pérdida de los recursos genéticos, razón por la cual se hace necesario caracterizar y evaluar los materiales colectados para su conservación y posterior utilización en programas de mejoramiento (Romero *et al.* 2008).

Ante el déficit cada vez mayor de la madera, los bambúes pasan a ser una alternativa viable y un producto no forestal que puede contribuir a mejorar los niveles de vida de los pobladores del campo en países tropicales y subtropicales del mundo. El uso de *Guadua angustifolia* como sustituto de la madera, no solamente puede garantizar la permanencia de las selvas y la biodiversidad, sino que contribuye sustancialmente al mejoramiento del ecosistema y al desarrollo socio-económico, además, es la única especie de bambú en América que ha sido identificada con un gran potencial para fijar dióxido de carbono atmosférico (Riaño *et al.* 2002).

En Colombia, aproximadamente 100.000 personas derivan su sustento del aprovechamiento, manejo y comercialización de la guadua (Giraldo y Sabogal 1999). Entre 1993 y 2002 la guadua generó recursos que ascienden a 8.611 millones de pesos (Mejía 2004). El 100% de las reforestaciones con bambú se han hecho hasta el momento con la especie *G. angustifolia*, existen en el eje cafetero aproximadamente 5.000 ha cultivadas y 23.000 ha naturales. Sus características físico mecánicas la convierten en un recurso natural no maderable de grandes perspectivas para promover procesos de desarrollo sostenible, sin deteriorar el capital natural, además, es un verdadero sustituto de la madera (Londoño 2006).

La mayoría de las colecciones de bambúes en América se encuentran en jardines botánicos y reúnen un gran número de especies introducidas del Asia, caracterizándose por la poca representatividad de las especies nativas. Sin embargo, la colección del Jardín Botánico Juan María Céspedes ubicado en Tuluá (Valle del Cauca), se ha especializado en el género *Guadua* y ha contribuido a asegurar la diversidad genética de este bambú nativo (Judziewicz *et al.* 1999). Esta colección establecida posee 45 entradas de *Guadua angustifolia* provenientes de 16 departamentos de Colombia, además, reúne otras especies

del género como *Guadua amplexifolia* Presl, *Guadua weberbaueri* Pilger y nuevas especies descritas como *Guadua uncinata* Londoño y Clark y *Guadua macrospiculata* Londoño y Clark (Londoño y Clark 2002). El establecimiento de bancos de germoplasma ha contribuido a la conservación del recurso, sin embargo, no se conoce el estado de la diversidad genética de poblaciones de guadua en el eje cafetero Colombiano.

Este trabajo tuvo como objetivo estudiar la diversidad genética de *Guadua angustifolia* y la estructura poblacional de guaduales en el eje cafetero colombiano usando marcadores moleculares microsatélites, con el propósito de utilizar los resultados en el futuro desarrollo de estrategias de conservación, selección de materiales superiores y programas de mejoramiento genético.

## 1. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA

El problema del agotamiento del recurso guaduelero se ha denunciado desde hace mucho tiempo por diferentes organismos nacionales. Sin embargo hace poco tiempo que la guadua viene siendo tratada como objeto de investigación. Entidades estatales y grupos privados se han encargado de recuperar la guadua con diversos fines. Las corporaciones regionales, se ocupan de la producción, manejo técnico y silvicultura, recuperación, promoción, difusión y control. A pesar que se reconoce a Colombia internacionalmente como país pionero en sistemas constructivos con bambú, la falta de materia prima uniforme y de buena calidad, que garantice la durabilidad de las construcciones en el tiempo, es una desventaja que afronta el sector de la construcción y la cadena de la guadua en Colombia. Se ha propuesto que estas variaciones en la calidad de los materiales pueden deberse al componente genético de los materiales utilizados (Muñoz y Londoño 2011).

Un factor importante para la conservación de poblaciones naturales de cualquier especie es el entendimiento de su estructura genética, lo cual se convierte en una herramienta básica para la planificación estratégica de su conservación y uso sostenible (Romero *et al.* 2008). La estructura genética de las poblaciones hace referencia a la distribución específica de alelos o genes para una población o grupo en particular. En Colombia se han realizado estudios de diversidad de bambúes (Londoño 1990) y estudios con marcadores moleculares (Marulanda *et al.* 2002; Marulanda *et al.* 2007; Potosí *et al.* 2006) de la especie *Guadua angustifolia* pero no se han relacionado con características de calidad para los diferentes sectores de la cadena productiva, además, los resultados encontrados han sido contrastantes, indicando baja diversidad en los bancos de germoplasma y alta diversidad en poblaciones naturales (*Op cit*).

La tala indiscriminada y explotación indebida de los guaduales ha generado una rápida pérdida de este recurso genético, además, la falta de estudios de diversidad genética en la especie plantea la necesidad de caracterizar morfológica y molecularmente poblaciones de *Guadua angustifolia* en el eje cafetero Colombiano para el mantenimiento de la especie como recurso biológico, genético y con potencial de uso industrial.

De esta manera, el programa “Mejoramiento de la productividad de *Guadua angustifolia* Kunth mediante la selección de materiales superiores y de la optimización del manejo silvicultural, para la obtención de materia prima de calidad: una contribución para el fortalecimiento de la competitividad de la cadena productiva con énfasis en el sector de la construcción”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y coordinado por la Universidad Nacional de Colombia (Muñoz y Londoño 2011), a través del proyecto “Selección,

genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero”, planteó la selección de materiales superiores y la evaluación de la diversidad genética, haciendo necesaria la realización de esta investigación como parte fundamental para el cumplimiento y desarrollo de las actividades planteadas.

## 2. JUSTIFICACION

La *Guadua angustifolia* sobresale dentro del género no solo por sus propiedades físico mecánicas sino por el tamaño de sus culmos (Sánchez *et al.* 2010). Ha sido seleccionada como una de las veinte mejores especies de bambúes del mundo, ya que su capacidad para absorber energía y admitir una mayor flexión, la convierten en un material ideal para construcciones sismo-resistentes, sin embargo, en los últimos dos siglos, se redujo ostensiblemente la extensión de guaduales en el país, pasando de doce millones de hectáreas a solo cincuenta mil (Agudelo y Toro 1994).

La disminución de la población original de guadua en el Eje Cafetero Colombiano se debe al avance de la agricultura de ladera, en especial a la consolidación del cultivo del café. Durante la colonización se utilizaron los guaduales como leña para hornos y como elemento maderero, haciendo vulnerables de desaparición a los guaduales naturales con el continuo crecimiento y expansión demográfica en el eje cafetero. La mayoría de las fincas ubicadas entre 1000 y 1500 msnm en el eje cafetero, han perdido su selva nativa y solamente se observan los guaduales ubicados generalmente a orilla de quebradas y ríos, los cuales sirven como refugio de la fauna local. Estos guaduales son ecosistemas que albergan más de 120 especies de plantas, 48 especies de aves, 20 especies de mamíferos y siete especies de reptiles (Londoño 2004).

Unicamente *Guadua angustifolia* ha tenido una apropiación cultural, un desarrollo tecnológico y una importancia económica local en el país. Sin embargo, los guaduales se han visto afectados en los últimos años por la tala indiscriminada y la destrucción de los bosques (Judziewicz *et al.* 1999), lo cual repercute directamente en la pérdida de recursos genéticos que aún permanecen desconocidos y que pueden ser de gran importancia en programas de manejo y mejoramiento de estas especies con valor comercial.

Por otro lado, conocer los patrones de distribución de la variación genética en recursos genéticos vegetales debe convertirse en objetivo primordial de las instituciones que realizan investigación. En estas especies, la variación se toma como el punto de partida para hacer mejoramiento genético por selección en características deseables no solo desde el punto de vista agronómico y nutricional sino también de la aceptación por los productores, para quienes estas especies tienen diferentes valores de uso (Stewart 1999). Estudios internacionales sobre bambúes plantean la necesidad de conocer la diversidad genética del recurso, establecer las bases para la conservación y el uso sostenible a través de la investigación, además, desarrollar estrategias complementarias de conservación para el uso de estos recursos genéticos (Rao y Rao 2000).

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo general**

- Evaluar la diversidad genética y estructura poblacional de *Guadua angustifolia* en el eje cafetero Colombiano.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Determinar la diversidad genética de guaduales a través de la estimación de parámetros de diversidad y el uso de marcadores moleculares.
- Identificar la estructura poblacional y flujo genético entre guaduales para determinar si se trata de una o más poblaciones y establecer el nivel de flujo genético entre ellas.
- Establecer relaciones entre los grupos genéticos formados y las procedencias geográficas de colecta a través de la caracterización molecular de los materiales colectados

## 4. MARCO REFERENCIAL

### 4.1 Descripción botánica

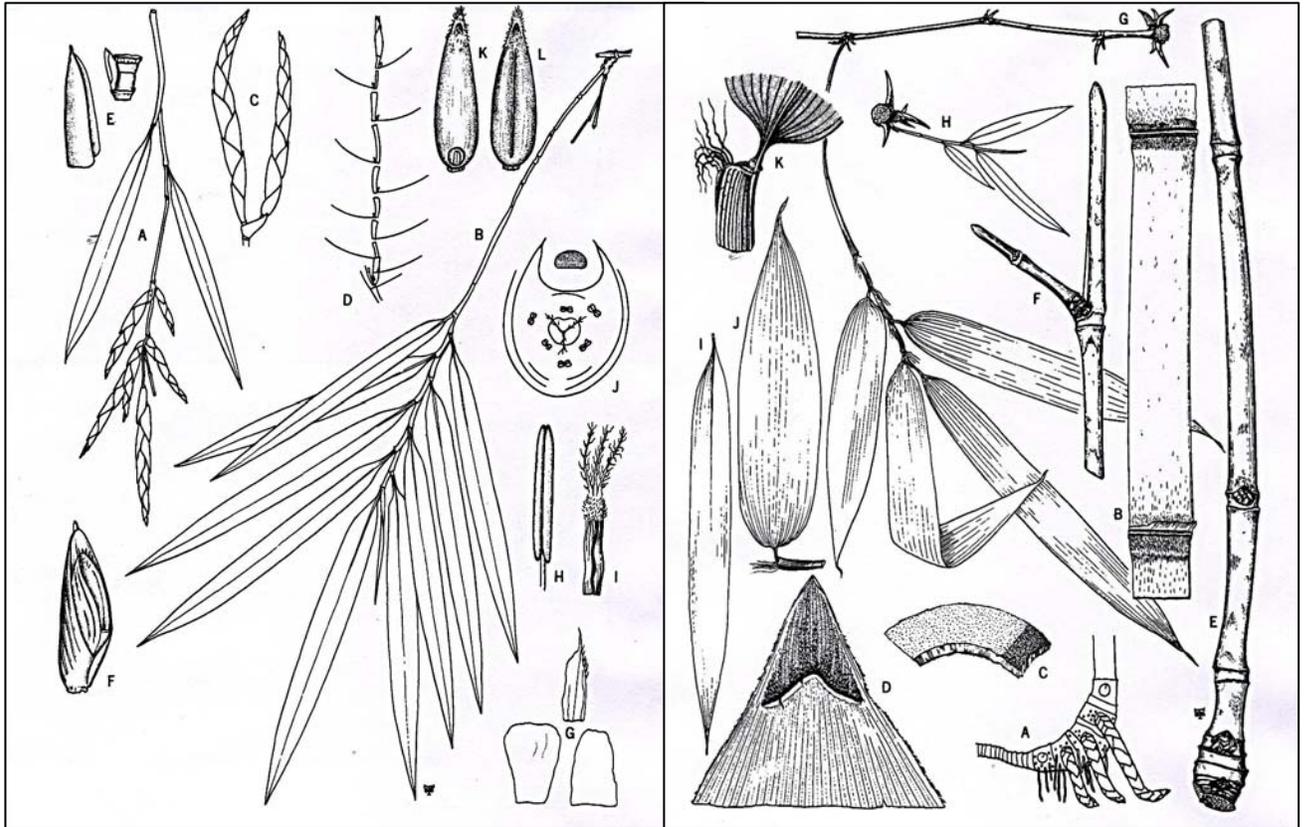
La guadua es un bambú leñoso de la familia Poaceae, sub-familia Bambusoideae y a la tribu Bambuseae. En 1820, el botánico Kunth, constituye este género utilizando el vocablo “guadua” con el que los indígenas de Colombia y Ecuador se referían a este bambú. Este género reúne aproximadamente 30 especies y se puede distinguir por los tallos robustos y espinosos, por las bandas de pelos blancos en la región del nudo y por las hojas caulinares en forma triangular. La especie *Guadua angustifolia* sobresale dentro del género por sus culmos que alcanzan hasta 30 metros de altura y 25 centímetros de diámetro (Pérez 2006). En *G. angustifolia* se reconocen taxonómicamente tres variedades: *Guadua angustifolia* var. *angustifolia* Kunth, *G. angustifolia* var. *bicolor* Londoño y *G. angustifolia* var. *nigra* Londoño (Londoño 1989; Londoño y Clark 2002). La morfología de la especie se describe de manera general en la Figura 1. Se ha propuesto alogamia como estrategia de reproducción sexual, con flores hermafroditas (Muñoz y Londoño 2011) y un número cromosómico  $2n=46$  (Londoño 1989).

### 4.2 Origen y distribución

La guadua es endémica de América y se considera como nativa de Colombia, Venezuela y Ecuador. Ha sido introducida a México y varios países centroamericanos, Islas del Caribe, Hawái y Asia (Figura 2). En Colombia se distribuye en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda, Valle del Cauca, Antioquia, Boyacá, Cauca, Caquetá, Casanare, Cundinamarca, Chocó, Huila, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Santander y Tolima (Londoño 2004).

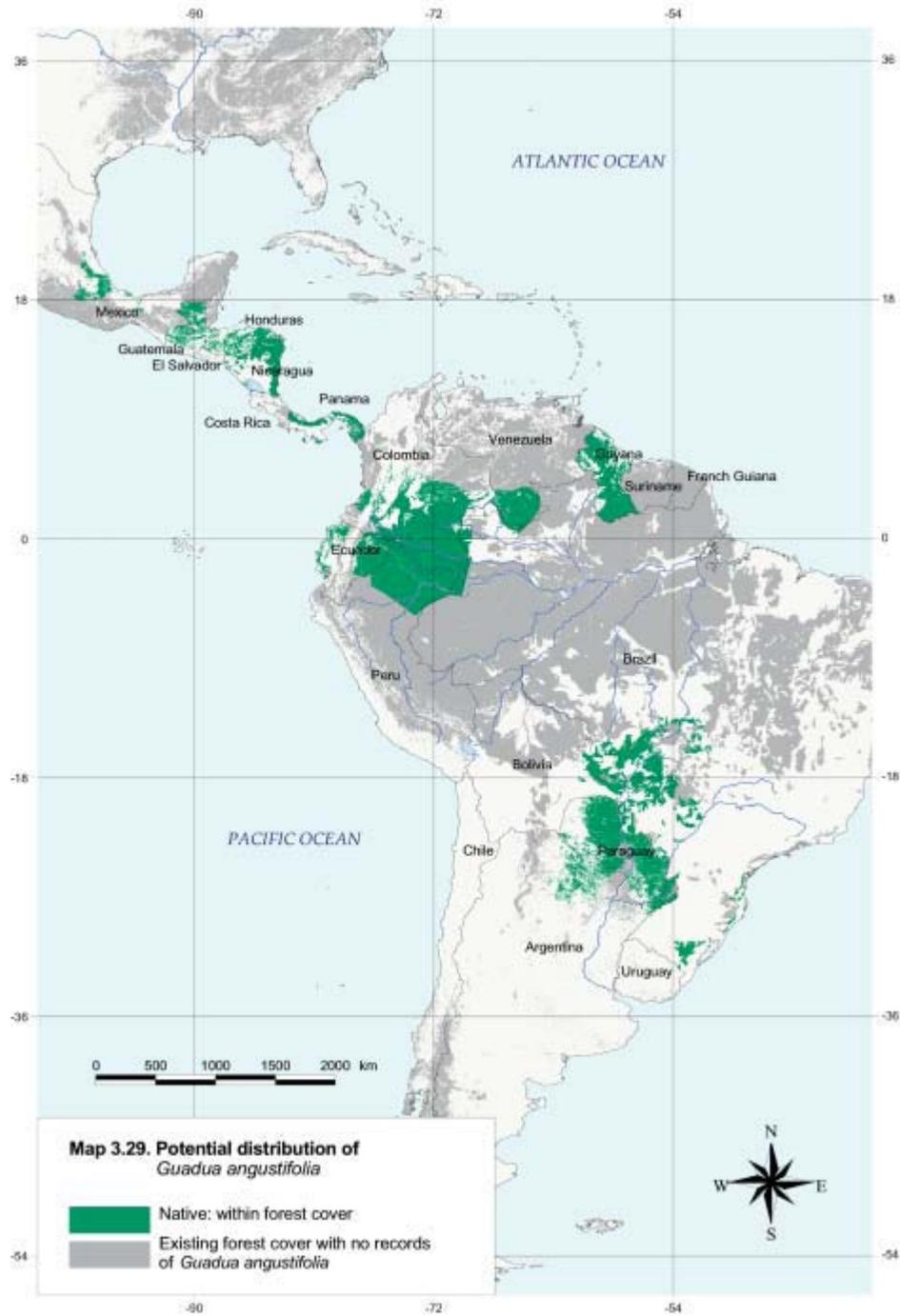
El área de guaduales naturales y cultivados, censados y estimados durante los últimos 25 años (1980-2005) es de 51,000 ha, de las cuales 46,000 ha (90%) son naturales y 5,000 ha (10%) son cultivadas (Castaño y Moreno 2004). En Colombia se ha registrado aproximadamente 100 especies de bambúes en 19 géneros, de las cuales 24 son endémicas. Estas especies en Colombia se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 4100 msnm (Judziewicz *et al* 1999; Londoño 1990; 2004) y ocupan las cinco regiones geográficas del país.

Figura 1. Morfología de la especie *Guadua angustifolia*.



Izquierda: A: rama florecida, B: rama estéril, C: par de pseudoespigas, D: diagrama de la sección longitudinal de una pseudoespiga, E: bráctea y yema, F: flósculo, G: complemento de la lodícula, H: estambres, I: diagrama de la sección transversal del flósculo, J: fruto, lado del embrión, H: fruto lado del folículo. Derecha: A: base del culmo del rizoma, B: corte tangencial del internado y nudos, C: Sector de la sección transversal en la pared del tallo, D: ápice de la bráctea del culmo, vista por el lado interno, E: parte basal de las primeras ramas de primer orden de un nudo intermedio del culmo, F: ramas del segundo orden con yemas intactas, G: ramas del tercer orden mostrando espinas y follaje, H: complemento de la espina con una rama que sale del nudo más próximo de la espina, I y J: ejemplos de formas de hojas, K: ápices de la bráctea de la hoja y base de la misma (Hidalgo 2003)

Figura 2. Mapa de distribución potencial de *Guadua angustifolia*.



Fuente: Bystriakova *et al* (2003).

### **4.3 Propagación y producción**

Para la *Guadua angustifolia* la propagación asexual o vegetativa ha sido la más implementada (Castaño y Moreno 2004). La guadua tiene un óptimo de temperaturas entre los 20 y los 26 °C, con variaciones que pueden estar por debajo de los 11 y los 36 °C. Requiere precipitaciones entre los 1.300 y 4.000 mm, con buena distribución a lo largo de todos los meses del año y humedad relativa del 80%. La luminosidad para un excelente desarrollo de la guadua debe estar comprendida entre 1.800 y 2.000 horas/luz/año, aproximadamente de 5 a 6 horas/luz/día (Pérez 2006).

Ante la necesidad de normativas para establecer los métodos masivos de propagación se elaboró la Norma Técnica Colombiana NTC 5405 “Propagación vegetativa de *Guadua angustifolia* Kunth”, cuyos objetivos fueron establecer los requisitos mínimos de calidad que se deben seguir para el establecimiento de bancos de propagación de la especie, en donde se recomiendan 3 métodos de propagación vegetativa: chusquines, segmentos de culmo y el método por riendas.

### **4.4 Usos**

La guadua es considerada como uno de los bambúes de América más apropiados para la fabricación de papel. Su pulpa puede compararse con las pulpas obtenidas de *Bambusa tulda* de la india y *Arundinaria alpina* de África. Es utilizada para la construcción de muebles, objetos decorativos, instrumentos y edificaciones en bahareque. Ha representado el avance de la cultura en el eje cafetero, siendo utilizada desde la época prehispánica por los Quimbayas, en la colonia, por las clases marginales y actualmente se destaca en la fabricación de estructuras de ingeniería y aeronáutica (Pérez 2006). Es una de las especies forestales más utilizadas en el Eje Cafetero Colombiano y se emplea en forma masiva en el proceso de construcción (viviendas, edificaciones, estructuras como puentes, cercos, puertas, conducción de aguas), en fabricación de muebles, artesanías y en la producción de latas, laminados, molduras, tablillas, pisos, entre otros (Held y Manzano 2002). Se han identificado nueve materiales superiores de guadua en la región cafetera de Colombia: cinco para construcción, dos para muebles y artesanías y dos para pre-industrialización (Muñoz *et al.* 2011).

### **4.5 Marcadores moleculares**

Inicialmente las únicas diferencias observables entre individuos son los rasgos fenotípicos (coloración, tamaño, diferencias de crecimiento o comportamiento);

pero la variación genética correspondiente a estas diferencias puede estar controlada por varios genes, interacción entre ellos o influenciada por el ambiente. El desarrollo de la biología molecular ha dado como resultado un mayor entendimiento de las relaciones entre especies, acertada clasificación taxonómica y mayor habilidad para identificar especies y cultivares. Estas técnicas también permiten entender y utilizar mejor la diversidad genética por parte de los mejoradores (Graham y McNicol 1995).

Los marcadores moleculares permiten estimar la diversidad genética de las especies de forma rápida y segura, evaluando diferentes regiones del genoma. Existen distintos tipos de técnicas que ofrecen diferentes tipos de información según las características de la molécula o fragmento de molécula analizado donde lo más común es detectar diferencias de tamaño. A partir de las frecuencias con que aparecen cada una de las variantes (alelos) se estiman diferentes parámetros que dan la medida de la diversidad y permiten comparar entre las especies y/o estudios (Ferreira y Grattapaglia 1998).

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son motivos repetidos en tándem de entre 2 a 6 pb que se encuentran en todos los genomas de procariontes y eucariotes analizados. Están presentes en regiones codificantes y no codificantes y se caracterizan por un alto grado de polimorfismo. A pesar de que el mecanismo de evolución de los microsatélites es aún desconocido, han sido ampliamente utilizados en muchos campos desde su descripción, como en mapeo de genomas, análisis de ADN antiguo y técnicas forenses, estudios de genética de poblaciones y manejo y conservación de recursos biológicos. En los últimos años, los marcadores moleculares microsatélites se han convertido en los marcadores más populares dado su alto polimorfismo y su relativamente fácil estandarización, que representan las dos principales características, además, su capacidad para diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, hacen de los microsatélites un tipo de marcadores de gran interés para estudios de diversidad genética (Zane *et al.* 2002).

#### **4.6 Diversidad genética**

La variabilidad genética es un componente básico de la biodiversidad y su trascendencia es bien conocida en el campo de las plantas cultivadas. Desde los comienzos de la agricultura, jugó un papel relevante en los procesos de mejoramiento genético. En los últimos años, los intereses siguen centrados en la diversidad genética y su conservación en los germoplasmas originales (Vallejo y Estrada 2002). Los resultados obtenidos en la utilización de varias especies vegetales en diferentes aplicaciones agropecuarias se han caracterizado por ser muy variables, dada la alta diversidad fenotípica de los materiales utilizados. Estas diferencias podrían atribuirse a factores como variación genotípica de la

especie, variación ambiental o a la interacción genotipo – ambiente (Rosales *et al.* 1992). En especies en donde predomina la multiplicación vegetativa, la posibilidad de lograr cultivos uniformes genéticamente (originados a partir de clones) es un factor a favor de su establecimiento, propagación y utilización a escalas mayores (Ríos 1993).

Para el eje cafetero se describen varios biotipos de *G. angustifolia* (Gómez *et al.* 2001) (Figura 3) caracterizados por marcadores morfológicos como tipo, grosor de la pared del culmo y tipos de hojas caulinares; también han tenido en cuenta otros criterios como costumbres campesinas, terminología vernácula y propiedades físico mecánicas. Estos biotipos son denominados “cebolla”, “macana”, “cotuda” y “castilla”. Estos biotipos o formas responden a condiciones climáticas y edáficas específicas (Londoño 2004). Se ha propuesto que las variaciones observadas en diferentes poblaciones de guadua en el eje cafetero, expresadas en diámetros, espesor de la pared, longitud de los entrenudos, altura, dureza, entre otras, responden más a una variación de carácter fenotípico expresada por efecto del ambiente. Sin embargo, no se ha considerado la variación genética y las prácticas de manejo, que pueden ser importantes para explicar la variación en productividad y calidad (Camargo 2006).

Figura 3. Variedades botánicas de la guadua: *G. angustifolia* var *angustifolia*, *G. angustifolia* var. *Bicolor* y *G. angustifolia* var *nigra*



Fotos: Ximena Londoño de la Pava ©

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética en bambúes se ha incrementado en los últimos años. Se conocen estudios con RFLP's en el género *Phyllostachys*, (Friar y Kochert 1994), análisis de isoenzimas de una selección de cinco géneros (Heng *et al.* 1996), filogenia utilizando fragmentos de ADN cloroplástico de bambúes Asiáticos (Watanabe *et al.* 1994) y bambúes del nuevo mundo (Kobayashi 1997); y el uso de marcadores de ADN

cloroplástico para determinar relaciones filogenéticas en el género *Chusquea* (Kelchner y Clark 1997).

Aunque es importante el conocimiento de la diversidad genética de poblaciones de guadua en Colombia, solo se han realizado cuatro estudios de diversidad genética involucrando marcadores moleculares. Usando la técnica AFLP se estudió la diversidad genética 55 materiales del banco de germoplasma del Jardín Botánico Juan María Céspedes en Tuluá (Marulanda *et al.* 2002). Algunas de las conclusiones de esta investigación fueron que la diversidad genética de los materiales evaluados de *Guadua angustifolia* no es significativa. Se identificaron dos grupos y se registró que la distancia genética presente al interior de éstos es mínima, lo cual indica que existe una alta similitud entre sus miembros.

Otro trabajo utilizando marcadores moleculares microsatélites descritos para caña de azúcar y arroz, evaluó la diversidad genética de 55 materiales, de los cuales, 37 pertenecen al banco de germoplasma del Jardín Botánico Juan María Céspedes en Tuluá (Marulanda *et al.* 2007). Como se esperaba dados los resultados de investigaciones previas, éste trabajo concluye que se forman dos grupos donde pueden diferenciarse entre biotipos de guadua y que existe una baja diversidad genética de los materiales evaluados. Los estudios moleculares han indicado que la diversidad genética al interior de esta especie no es significativa y que las variaciones observadas parecen estar influenciadas por el ambiente (Marulanda *et al.* 2002; Marulanda *et al.* 2007; Torres *et al.* 2009)

De manera contrastante al evaluar la diversidad genética de poblaciones naturales de guadua en el departamento del Cauca (Colombia), una evaluación de 120 materiales y utilizando marcadores moleculares tipo RAPD mostró una diversidad genética total alta, la presencia de 12 biotipos de guadua y alta diversidad entre los biotipos y al interior de ellos (Potosí *et al.* 2006), indicando la necesidad de evaluar la diversidad genética de poblaciones naturales de la especie en otras zonas geográficas del país y no solamente los bancos de germoplasma establecidos previamente.

Aunque los estudios de Marulanda *et al.* (2002) y Potosí *et al.* (2006) son bastante informativos, los marcadores empleados en los mismos (AFLPs y RAPDs, respectivamente) solo permiten responder algunas de las preguntas sobre las poblaciones de *G. angustifolia*. A su vez, estos, al ser dominantes, no estiman directamente las frecuencias génicas (sin asumir equilibrio Hardy – Weinberg), ni la variabilidad y no permiten hacer una buena asignación de parentales. Adicionalmente, a la hora de identificar o genotipificar cada uno de los individuos de forma específica los AFLPs, requerirían de un gran número de polimorfismos (Torres 2008).

## 5. DISEÑO METODOLÓGICO

### 5.1 Material vegetal

La colecta de material vegetal para extracción de ADN fue realizada previamente como una actividad relacionada al programa “Mejoramiento de la productividad de *Guadua angustifolia* Kunth mediante la selección de materiales superiores y de la optimización del manejo silvicultural, para la obtención de materia prima de calidad: una contribución para el fortalecimiento de la competitividad de la cadena productiva con énfasis en el sector de la construcción”, proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y coordinado por la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Para la realización de esta investigación se evaluaron tres muestras por cada uno de los 23 sitios seleccionados y pertenecientes al banco de ADN establecido en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (

Tabla 1). Además, se incluyeron tres materiales de *Guadua angustifolia* procedentes de Perú como grupo externo. Se realizó una base de datos computarizada utilizando el programa Diva-Gis versión 7.3.0.1 ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org)) en donde se registró la mayor cantidad de información disponible y se asignó un código único para cada material. Con la información geográfica disponible, los materiales se ubicaron espacialmente en un mapa de Colombia para la visualización gráfica de su distribución mediante el programa ArcGIS 9.3.1.

### 5.2 Caracterización molecular

#### 5.2.1 Evaluación de cantidad y calidad de ADN

Se estableció un banco de ADN con materiales colectados de poblaciones de guadua en 30 sitios diferentes en el eje cafetero. Estos sitios fueron seleccionados en investigaciones anteriores por presentar materiales con características superiores, mediante encuestas a los productores de la zona y colectas dirigidas (Muñoz y Londoño 2011). Para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN del banco previamente establecido, se realizaron geles de agarosa al 0,8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0045M; EDTA 0.001M) y teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/mL. Las concentraciones se determinaron por comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda.

Tabla 1. Datos de 23 sitios utilizados para el análisis molecular y datos geográficos disponibles.

SITIO	FINCA ó HACIENDA	COORDENAS DE UBICACIÓN		
		Latitud N	Longitud O	Altura (m)
A	La Esmeralda	4° 51` 83"	75° 80` 25"	-
D	Hacienda Nápoles	4° 55` 50"	75° 80` 36"	1247
E	Hacienda Nápoles	4° 33` 25.6"	75° 48` 28.1"	1223
H	Finca la Secreta	4° 35` 50.5"	75° 39` 34.4"	1616
J	Finca El Ocaso potrero la Laguna	4° 35` 54.6"	75° 48` 58.6"	1164
K	Finca El Ocaso potrero El Guácimo	4° 35` 54.6"	75° 48` 58.6"	-
L	Finca Balsora	4° 31` 7.4"	75° 46` 17.3"	1190
M	Finca La Mejorana	4° 36` 25.1"	75 44` 77"	1420
N	Finca El Ocaso	4° 35` 54.6"	75° 48` 58.6"	-
O	Finca Yarima	4 ° 47 ` 0.7"	75° 47` 17.6 "	1221
P	Finca Eupen	4° 50` 09.6"	75° 49` 28.5"	1140
Q	Finca Eupen	4° 50` 25.4"	75° 49` 15.8"	1135
R	Finca Filipina	4° 44` 9.7"	77° 45` 15.5"	1298
S	Finca la Esmeralda	4° 44` 9.8"	75° 46` 26"	1212
T	CEBG	4° 24` 07.33"	75° 42` 56.49"	1176
U	Finca la Piragua	4 ° 58` 3.8"	75 ° 42` 55 "	1153
V	Finca la Española	4° 57` 7.8"	75° 42` 4.9"	1020
W	Finca el Naranjal	4° 58` 6.3"	75° 39` 41.3"	1318
X	Finca La Esperanza	5 ° 00` 1.5 "	75° 33` 52.4"	1776
Y	Finca Lomas	5 ° 00` 19.6"	75° 35` 12"	1308
Z	Finca El Nogal	5° 0.1` 22.3"	75° 39` 25.5 "	1318
α	Villa Martha	4° 51` 54.5"	75° 45` 08.9"	1320
γ	Finca Corozal	4° 40` 27.1"	75° 50` 30.5"	-

### 5.2.2 Marcadores moleculares Microsatélites

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Se evaluaron los únicos 9 marcadores microsatélites disponibles y descritos previamente para *Guadua angustifolia* (Tabla 2) con las condiciones de amplificación por PCR descritas por Pérez-Galindo *et al* (2009). Los productos amplificados fueron visualizados en geles de poliacrilamida denaturante al 4% (19:1 acrilamida – bisacrilamida)

corridos a 1600 voltios por una hora y teñidos con sales de plata como se describe en protocolos estándar (Sambrook *et al.* 1989).

Tabla 2. Marcadores microsatélites utilizados para la caracterización molecular (Pérez-Galindo *et al.* 2009).

Locus No.	Secuencia de cebadores 5' - 3'	Motivo repetido	Tamaño (pb)	Tm	No. Alelos
FJ444930	R: CCTTCACATGGTCTCACAAG F: CAGTCTAGCAATCAATTTGAAG	(GATA)8	225-270	55	7
FJ444929	R: CTAGATCTTCCTAATCAAAGTGG F: TACTAACCGATTGTCCCGTCTAG	(GATA)10	240-260	48	8
FJ444932	R: CGCCACGTTAATCCCAGTTAGG F: CCTATACATATATGCATTGTGTGG	(CTAT)10	450-500	54	4
FJ476075	R: GTTCCTACATGTAGACATATCC F: CTCTTGGGAGTGAGCATGGTGAC	(CTAT)13	175-195	48	5
FJ444934	R: CCCGACAGATAGATGGTCAAA F: CTCATTTCTCAATTGCCGAAGAG	(GATA)16	170-190	50	8
FJ444931	R: GTCAATCACGCCAGCTCTAACA F: CTCTGACATGTATGGATCTTGCA	(GATA)16	225-275	50	9
FJ444936	R: CCCAACAAAGATGGTCAGAT F: CAGGAGATGAGCCTGTTAGT	(GATA)9	180-220	55	9
FJ444935	R: CTAGGCCCACTCCTATCCCA F: AGCTTCCTCAGAATGCCTAATTA	(CTAT)8	210-260	55	3
FJ476076	R: CCTTCAATTAGTACATAGATAG F: GTACAGAACCATCTCATCCT	(GATA)8	230-255	55	4

### 5.3 Análisis de la información

La información de los patrones de bandas obtenidos se registró en una matriz numérica en donde se asignó un consecutivo para cada uno de los alelos encontrados por locus y a cada individuo se le asignó un máximo de dos valores por locus, dependiendo de su genotipo (homocigoto – heterocigoto) (Anexo A). Para la selección de bandas polimórficas se consideró como locus polimórfico aquel en el cual la frecuencia del alelo más común fue menor al 95%. A partir de esta matriz y usando los programas NTSYS- pc (Numerical Taxonomy System for Personal Computer), TFPGA (Tools for Population Genetic Analysis) y Arlequin versión 3.11 se realizaron los análisis estadísticos.

La similitud genética se calculó mediante el coeficiente de Nei- Li,  $S = \frac{2a}{(2a+b+c)}$  donde a = bandas compartidas por ambos individuos, b = bandas presentes en el individuo (1) pero no en (2), y c = bandas presentes en el

individuo (2) pero no en (1). El dendrograma que indica la agrupación de los materiales se realizó con el programa NTSYS –pc utilizando el método UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. Se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) para asociar columnas y filas de la matriz determinando el nivel de asociación o determinar proximidad (Joseph *et al.* 1992). Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio (H) y el porcentaje de loci polimórficos (P), los cuales se estimaron sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de Nei (1973), así:

$$H = 1 - \sum f(i)^2$$

Donde f(i): Frecuencia del alelo i en la población.

$\sum f(i)^2$ : Probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan el alelo i.

H: probabilidad de que dos individuos tomados al azar tengan diferente alelo, además, es el valor con el que se representa la diversidad de la población.

Se estimaron otros parámetros de diversidad genética y para descripción de las poblaciones y marcadores moleculares de acuerdo a las metodologías descritas por Caujapé (2006):

**Probabilidad de pérdida alélica (L):** es la probabilidad de que una muestra de N poblaciones no contenga un alelo con frecuencia poblacional p y se estimó mediante la ecuación  $L = (1 - p)^{2N}$ .

**Frecuencia mínima alélica (Pa):** hace referencia a la mínima frecuencia con la cual se tiene la certeza de estimar una frecuencia alélica en particular y depende del tamaño muestral. Es estimada a partir de la ecuación  $Pa = 1 - \alpha^{\frac{1}{2n}}$ , donde  $\alpha$  es el nivel de confianza (0,05) y n, el tamaño de la población muestreada.

**Probabilidad de alelos nulos (r):** se estimó mediante la ecuación  $r = \frac{(He - Ho)}{(1 + He)}$ ,

donde He es la heterocigosidad esperada y Ho la heterocigosidad observada. Si es negativa o muy baja, puede considerarse que la presencia de una sola banda corresponde con un homocigoto y no con un heterocigoto con un alelo nulo.

**Número efectivo de alelos (ENA):** hace referencia a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación (Kimura y Crow 1964) y se estimó mediante

la ecuación  $ENA = \frac{1}{\sum P_i^2}$ .

**Prueba de neutralidad de Ewens-Watterson:** la prueba calcula un intervalo de confianza al 95% (L95-U95) del valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad.

**Prueba de equilibrio Hardy-Weinberg (HW):** Se realizó mediante la prueba de  $\chi^2$  ( $X^2$ ) para las desviaciones de las frecuencias génicas con respecto a lo esperado bajo el supuesto de HW.

**Prueba de desequilibrio de ligamiento:** Las desviaciones de las frecuencias gaméticas observadas respecto de las esperadas en equilibrio se cuantificó mediante el parámetro de desequilibrio en el ligamiento (D) (Slatkin 1994). La prueba fue realizada mediante el programa Arlequín 3.11 y utilizando 10000 permutaciones

**Contenido de información polimórfica (PIC):** El PIC se refiere a la medida de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Se estimó mediante la ecuación:

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n P_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2 .$$

**Probabilidad de identidad (I):** indica que tan alto es la probabilidad de encontrar dos individuos al azar iguales en un locus en particular y por tanto, que tan discriminante es ese sitio para cada marcador. Se estimó usando la ecuación

$$I = \sum P_i^4 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (2P_i P_j)^2 , \text{ donde } P \text{ es la frecuencia del alelo y } n \text{ es el número}$$

de alelos.

**Poder discriminante (Pd):** es una estimación de la probabilidad de que dos accesiones muestreadas al azar puedan ser distinguidas por sus perfiles genéticos (alelos) en un determinado locus (Kirst *et al.* 2005). Se estimó usando la ecuación  $Pd = 1 - I$ .

**Índice de consanguinidad (F):** es la probabilidad de que los dos alelos de un gen de un individuo diploide sean idénticos por descendencia. Se estima por la reducción de heterocigosidad según la fórmula  $F = \frac{(H_o - H_e)}{H_e}$ , donde  $H_o$  es la heterocigosidad observada y  $H_e$  la heterocigosidad esperada (Caujapé 2006).

Se realizó una prueba de Mantel, la cual es una metodología no paramétrica que permite evaluar la significación de la correlación entre matrices de distancia. La correlación entre matrices de distancia no puede probarse de la forma paramétrica, ya que la mayoría de distancias convencionales violan el requisito de independencia exigido (Caujapé 2006). Mantel (1967) desarrolló una prueba para

evaluar el grado de correlación entre matrices de distancia referidas a las mismas poblaciones pero basadas en diferentes variables que empezó a aplicarse en geografía y medicina y que luego encontró aplicación en biología poblacional (Sokal 1979). Dado que las matrices de distancias (genética y geográfica) deben ser simétricas para la realización del análisis (contener el mismo número de datos) y se disponía de solo un dato de geo-referencia para cada sitio evaluado, la matriz de distancias genéticas fue construida utilizando los datos de un solo individuo. La matriz de distancias geográficas fue construida utilizando el programa Diva-Gis 7.3.0.1 ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org)) (Anexo D) con base en los datos de geo-referenciación. La matriz de distancias genéticas al igual que la prueba de Mantel, fueron realizadas con el programa NTsys.pc (Rohlf 1988).

Se realizó un análisis discriminante utilizando el programa SAS versión 9.0 y con los datos obtenidos de los nueve marcadores moleculares microsatélites (Anexo E) para verificar la validez de los grupos genéticos formados para los análisis de diversidad, análisis de varianza molecular e índices de fijación.

Se estimaron como parámetros poblacionales los índices de fijación descritos por Wright (1931), los cuales miden la estructuración genética a diferentes niveles espaciales (Caujapé 2006). Dado que ante un conjunto de poblaciones de una misma especie (o también en una población dividida en varias subpoblaciones) se distinguen tres niveles de complejidad: el de los organismos individuales, el de las diferentes poblaciones o subpoblaciones y el de la población total. Se estimaron los parámetros de flujo genético entre poblaciones de acuerdo a lo descrito por Wright (1951). Se realizó un análisis de varianza molecular para evaluar la existencia de diferenciación genética entre y dentro de las poblaciones, asumiendo que los materiales colectados en cada sitio corresponden a una población diferente.

**Análisis de varianza molecular (AMOVA):** Este método sirve para estudiar la variación molecular dentro de una especie y se basa en un modelo jerárquico y anidado. En este caso fue usado para verificar el porcentaje de la variación que es atribuible a la variación entre los grupos, dentro de los grupos y la variación individual dentro de grupos, utilizando el siguiente modelo:

$$Y_{ki(j)} = Y + A_k + B_{k(i)} + W_{ki(j)}$$

Donde:

A<sub>k</sub>: Efecto de la k-ésima población con varianza  $\sigma^2_a$

B<sub>k(i)</sub>: Efecto del i-ésimo individuo dentro de la k-ésima población, con varianza  $\sigma^2_b$

$W_{ki(j)}$ : Efecto del j-ésimo locus del i-ésimo individuo de la k-ésima población, con varianza  $\sigma^2_w$

**Tasa de reproducción cruzada (t):** La t es una transformación del valor del índice de fijación ( $F_{is}$ ) que estima el grado de intercambio genético intra-poblacional. Se estimó basada en los índices de fijación de Wright (1951) y mediante la ecuación

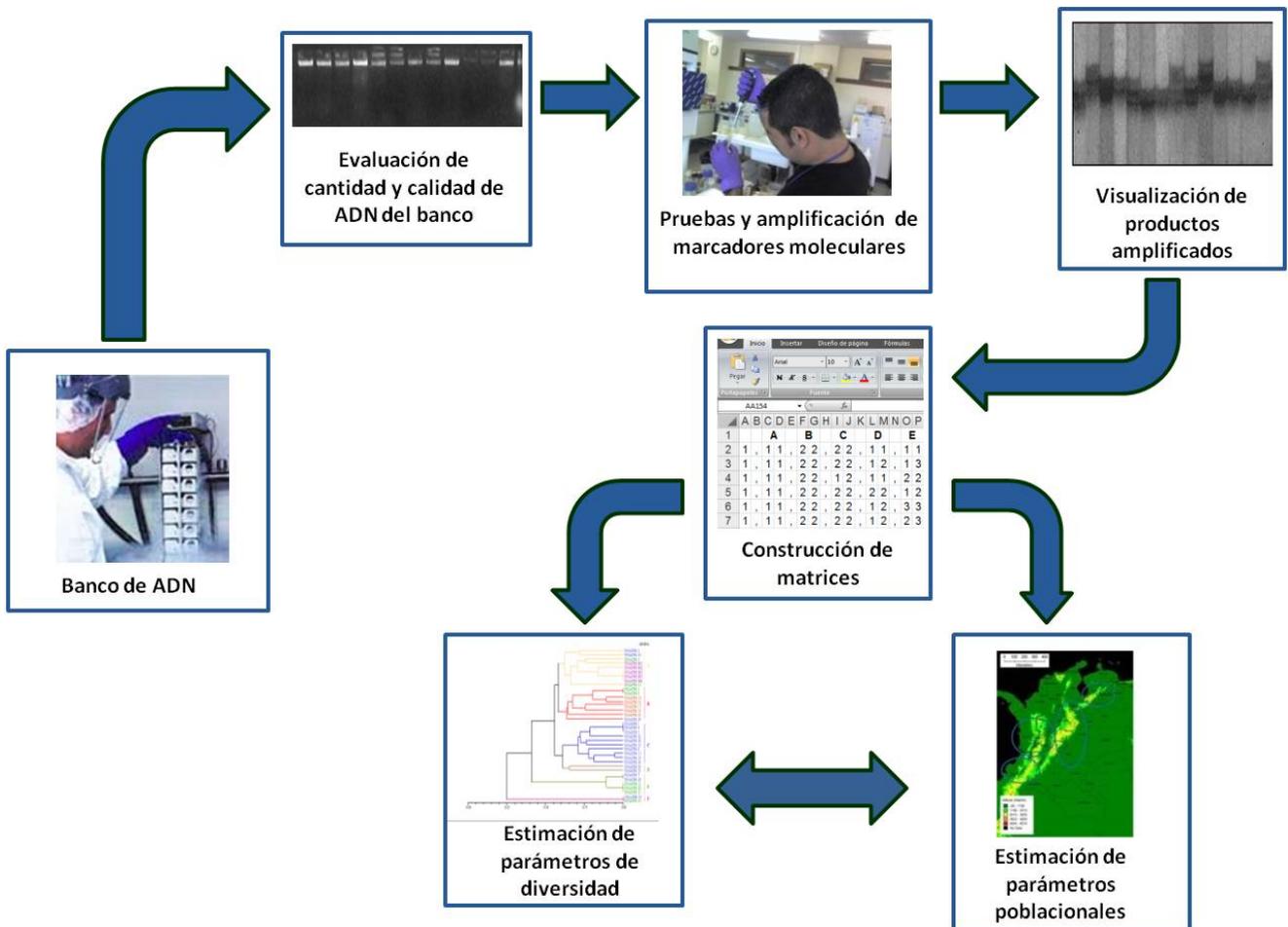
$$t = \frac{1 - F_{is}}{1 + F_{is}} \text{ (Weir y Cockerham 1984).}$$

**Flujo genético entre los grupos o poblaciones:** se estimó el número medio de migrantes por generación ( $Nm$ ), el cual hace referencia al promedio de individuos que intercambian dos o más poblaciones en una generación. Si se disponen de datos para varios loci multialélicos, Wright (1931) mostró que, asumiendo que los alelos son neutrales, se puede estimar el nivel de flujo genético entre las

poblaciones mediante la ecuación:  $F_{st} = \frac{1}{(1 + 4Nm)}$ . La metodología resumida y

de manera secuencial se presenta en la Figura 4.

Figura 4. Diagrama resumido de la metodología utilizada en el proyecto.

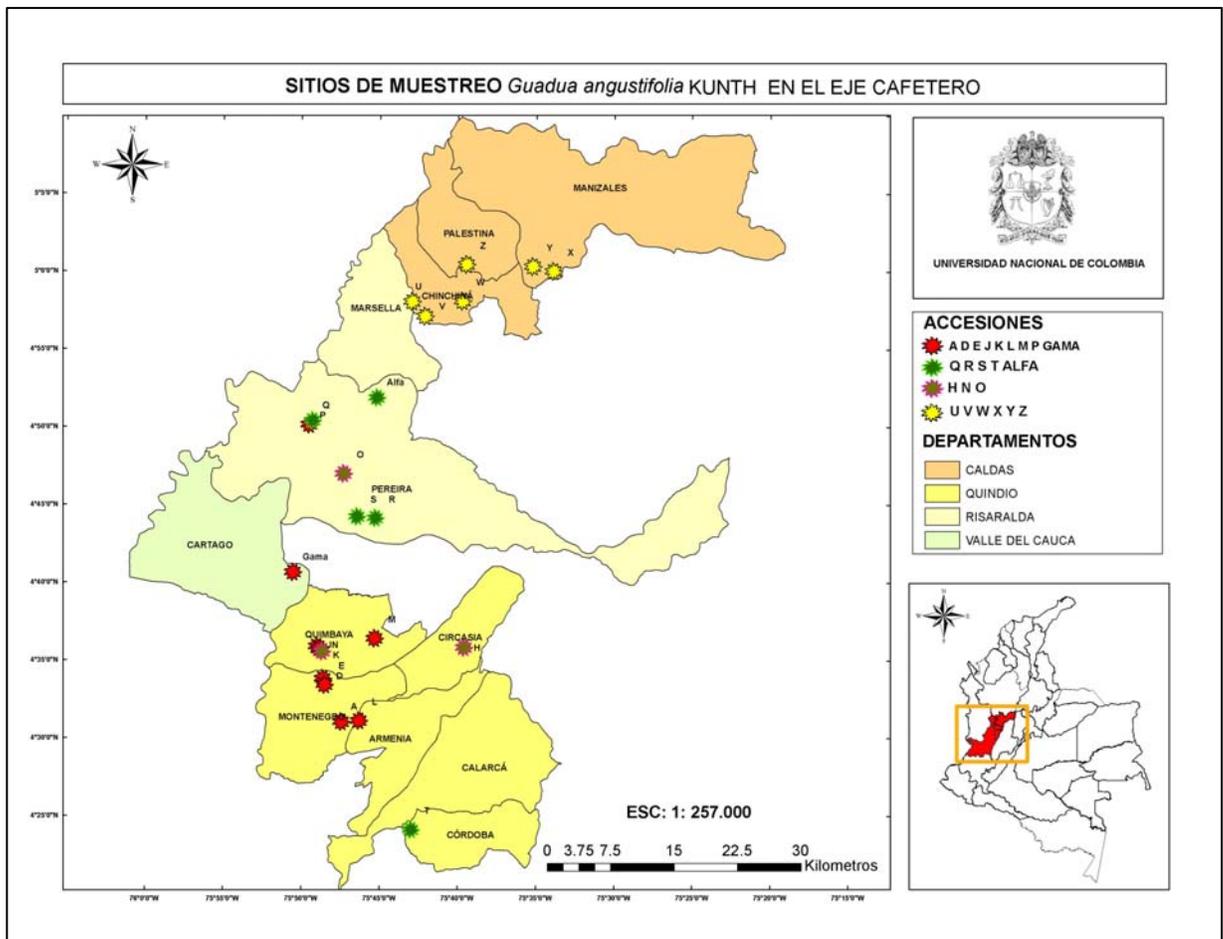


## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Material vegetal y banco de ADN

El mapa con la distribución geográfica de los sitios muestreados en este estudio se presenta en la Figura 5. La ubicación espacial de los materiales permitió proponer una primera aproximación para la formación de los grupos evaluados en los análisis siguientes de diferenciación poblacional, flujo y distancias genéticas.

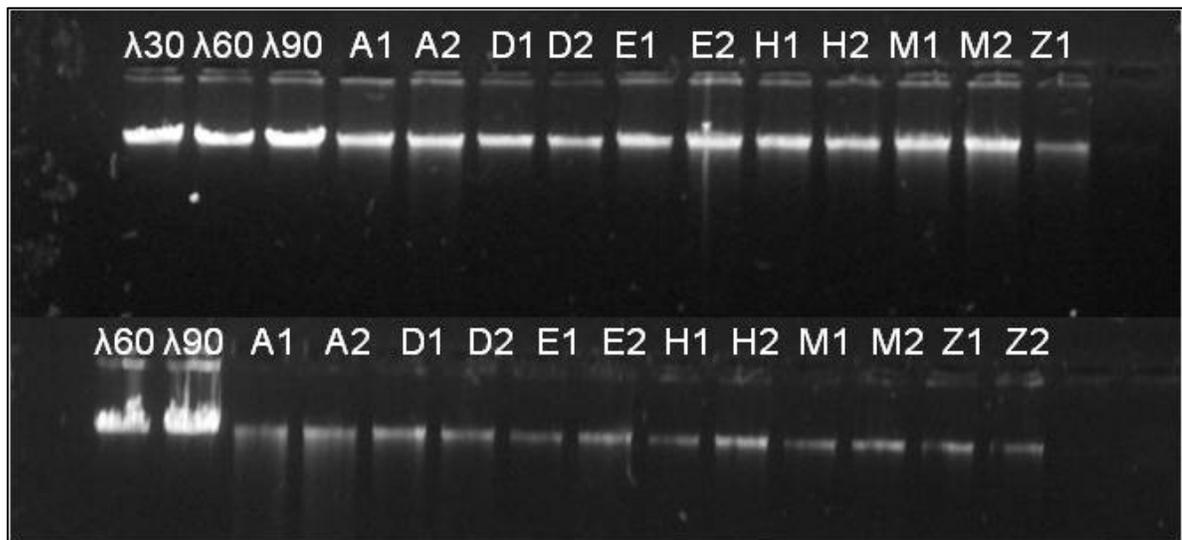
Figura 5. Mapa de la distribución geográfica de los materiales utilizados en este estudio.



La cuantificación del ADN mediante comparación con concentraciones conocidas del bacteriófago Lambda permitió determinar de manera adecuada las concentraciones del banco de ADN, encontrándose entre 50 y 300 ng/μl (Figura 6); concentración suficiente para la amplificación por PCR de los marcadores moleculares. Esta técnica permitió realizar la cuantificación de manera rápida y menos costosa ya que no requiere de la utilización de equipos especializados como espectrofotómetros o fluorómetros ni la utilización de reactivos tóxicos y peligrosos, lo que la propone como una metodología de fácil y rápida implementación para la cuantificación de ADN total.

El banco de ADN de guadua se encuentra establecido con 90 muestras colectadas en 30 sitios del eje cafetero colombiano y está disponible en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira a una temperatura de -50 °C acompañado de una base de datos computarizada en la cual se encuentran registrados los datos de pasaporte disponibles por material (Anexo B).

Figura 6. ADN de materiales del banco establecido y cuantificación mediante comparaciones con patrones de ADN de Lambda.



Uno de los problemas más frecuentes en las colecciones y bancos de germoplasma se relaciona con la insuficiencia de datos de pasaporte que acompañan la accesión al ingresar a las facilidades de conservación (Painting *et al.* 1993). No contar con dicha información provoca un uso ineficiente de los recursos y disminuye la posibilidad de utilizar inmediatamente el potencial de la accesión. En el caso del banco de ADN de guadua, se cuenta con información detallada por colecta, lo que permitirá la utilización de estos materiales en futuros

estudios de diversidad genética a nivel nacional y estudios filogenéticos tendientes a dilucidar las relaciones entre las diferentes especies del género *Guadua*. Además, permitirá la realización de trabajos futuros en donde se involucren estudios poblacionales, de conservación y mejoramiento genético. De este modo se pretende facilitar el uso directo de los genes y las secuencias regulatorias existentes en los recursos genéticos, acelerar la identificación y clonación de genes valiosos existentes y a la vez hacer más directa su transferencia a especies cultivadas mediante transgénesis. Sin embargo, es importante señalar que esta iniciativa aún se encuentra a nivel experimental debido a los costos implicados. Considerando que la amplia mayoría de los procesos y las características de interés para el mejoramiento vegetal se regulan por una gran cantidad de genes que actúan en forma compleja entre sí, su utilidad se limita a genes de herencia simple, entre los cuales se destacan genes de resistencia a enfermedades, genes reguladores de enzimas involucradas en el metabolismo secundario y proteínas de importancia nutricional (Campos y Seguel 2000).

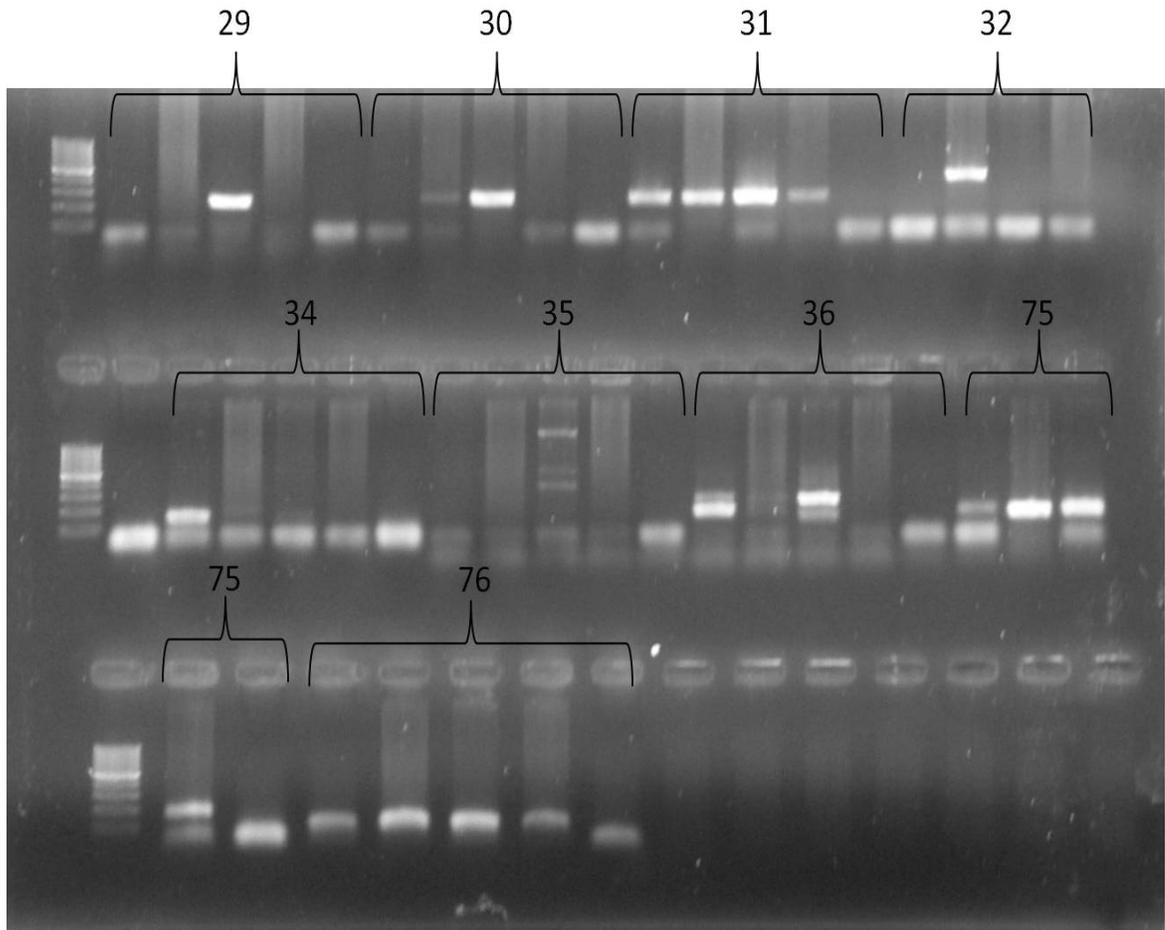
## 6.2 Amplificación por PCR de marcadores moleculares microsatélites

Las condiciones de amplificación descritas por Pérez-Galindo *et al* (2009) fueron modificadas debido a la ausencia o pobre amplificación en la gran mayoría de los marcadores utilizados (Figura 7). Los cambios realizados correspondieron a la adición de albúmina de suero bovino (BSA) para mejorar la calidad de productos amplificados (Sambrook *et al.* 1989). Las condiciones de amplificación se presentan en la Tabla 3. La ausencia o la pobre amplificación pueden ser explicados por la calidad del ADN utilizado, en donde se requirió de BSA como adyuvante dado que incrementa la eficiencia de la PCR y actúa como proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la *Taq* polimerasa (*op cit*).

Tabla 3. Condiciones de amplificación para los nueve marcadores microsatélites utilizados

<b>Compuesto</b>	<b>[ ] Inicial</b>	<b>[ ] Final</b>
Tampón <i>Taq</i>	10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	50 mM	2 mM
DNTPs	1.25 mM	0.2 mM
BSA	10mg/ml	0.4 mg/ml
ADN	20 ng/ul	40 ng
Cebadores	10 uM	0.5 uM
<i>Taq</i>	5 U/ul	0.5 U
Volumen final		25 ul

Figura 7. Productos amplificados por PCR de nueve marcadores microsatélites utilizados.



Al utilizar BSA se obtuvieron bandas claras y únicas en varios marcadores, sin embargo, en algunos se obtuvieron bandas inespecíficas (Figura 8) que obligaron al aumento de la temperatura de hibridación para cada uno de los marcadores evaluados, hasta obtener una banda única. Las temperaturas óptimas de hibridación para cada uno de los marcadores se presentan en la Tabla 4. Los fragmentos obtenidos se encontraron de acuerdo a los rangos establecidos previamente por Pérez-Galindo *et al* (2009), entre 170 y 500 pb.

Figura 8. Productos amplificados después de la utilización de BSA. Nótese la aparición de bandas inespecíficas en el marcador FJ476075

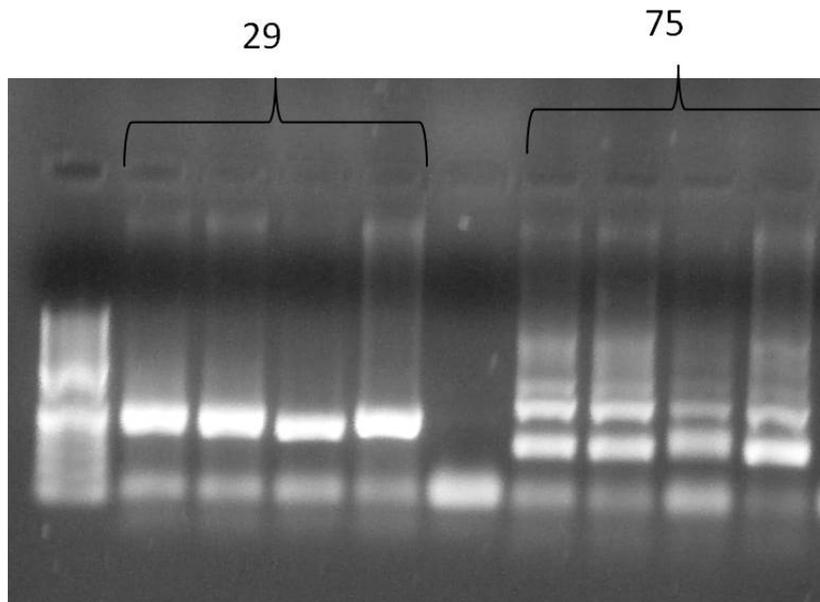


Tabla 4. Rangos de tamaño y temperaturas de hibridación para los nueve marcadores microsatélites utilizados.

<b>Marcador</b>	<b>Motivo repetido</b>	<b>Tamaño (pb)</b>	<b>Temperatura de hibridación (°C)</b>
FJ444930	(GATA)8	225-270	52
FJ444929	(GATA)10	240-260	55
FJ444932	(CTAT)10	450-500	52
FJ476075	(CTAT)13	175-195	55
FJ444934	(GATA)16	170-190	52
FJ444931	(GATA)16	225-275	52
FJ444936	(GATA)9	180-220	52
FJ444935	(CTAT)8	210-260	52
FJ476076	(GATA)8	230-255	55

### 6.3 Visualización de productos amplificados

El tiempo de corrida debió ser adaptado dependiendo del tamaño de cada microsatélite, variando entre 50 minutos y 1 hora con 20 minutos. La técnica permitió la diferenciación clara de individuos homocigotos de heterocigotos (Figura 9) y tuvo el suficiente poder de resolución para revelar los diferentes patrones de bandas (alelos) presentes en la población evaluada (Figura 10).

A pesar que la técnica empleada en este estudio para la visualización de los productos amplificados resultó adecuada para el alcance de los objetivos y tuvo un buen poder de resolución, la elaboración de geles de poliacrilamida es una labor que demanda mano de obra calificada, es dispendiosa y requiere de aproximadamente 4 horas para su implementación por cada gel realizado (datos no mostrados), además, la tinción con sales de plata genera una gran cantidad de residuos tóxicos que deben ser dispuestos de la manera más adecuada. Por lo anterior, si existe la disponibilidad presupuestal para realizar el análisis de los marcadores moleculares microsatélites, se recomienda la utilización de secuenciadores automáticos para la determinación rápida y precisa de los alelos presentes en la muestra.

Figura 9. Patrones de bandas obtenidos con el microsatélite FJ476075. Nótese la clara diferenciación de individuos homocigotos (izquierda) de heterocigotos (derecha)

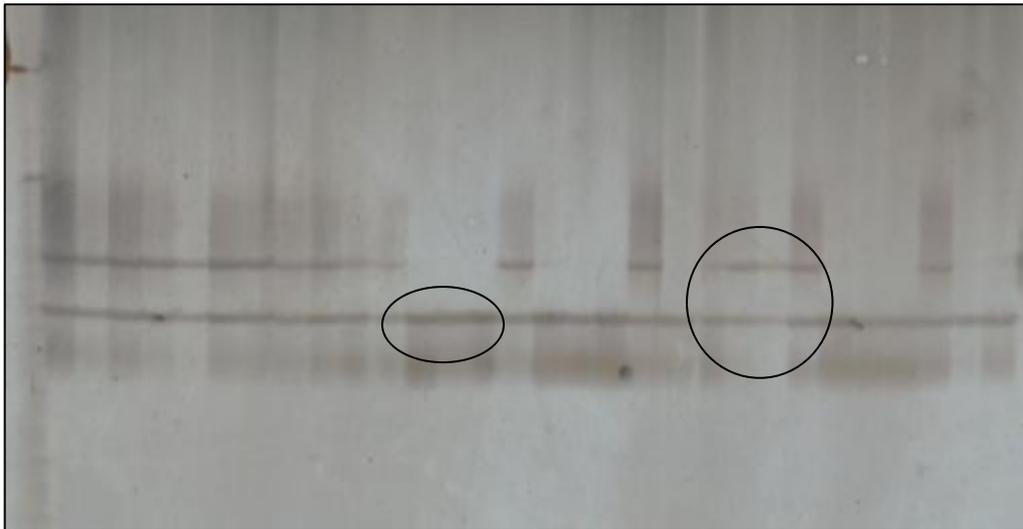


Foto: Andrés Posso ©

Figura 10. Patrones de bandas obtenidos con el microsatélite FJ476076. Nótese los diferentes patrones de bandas (alelos) obtenidos.

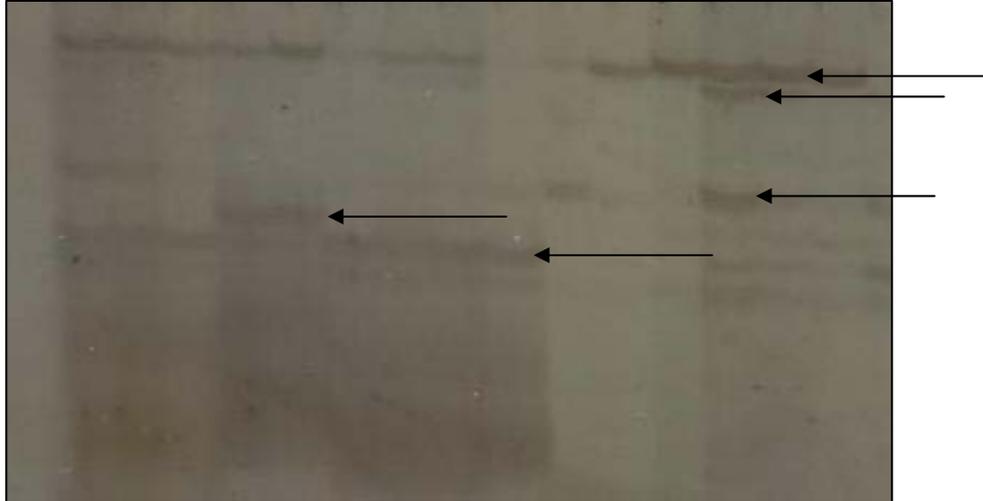


Foto: Andrés Posso ©

#### 6.4 Características de los marcadores utilizados

El número de alelos encontrado en la población estudiada con los nueve marcadores utilizados varió entre 2 y 5 (Tabla 6). Estudios anteriores reportaron la presencia de entre 3 y 9 alelos para los nueve marcadores (Pérez-Galindo *et al.* 2009), sin embargo, esta investigación utilizó materiales de *G. angustifolia* de diferentes zonas geográficas del país. Torres *et al* (2009) obtuvieron entre 5 y 14 alelos mediante la amplificación con ocho marcadores, sin embargo, este resultado es explicado por la inclusión de materiales pertenecientes al Banco Nacional de *G. angustifolia*, el cual posee representantes de todo el país. El bajo número de alelos encontrado en el presente estudio puede ser explicado por la relativamente estrecha zona geográfica de colecta y análisis de materiales o a la genética misma asociada a cada uno de los materiales evaluados.

La probabilidad de pérdida alélica (L) es la probabilidad de que una muestra de N poblaciones no contenga un alelo con frecuencia poblacional P. Valores por debajo del 10% son considerados como bajos (Caujapé 2006). Para la mayoría de alelos encontrados, este valor resultó por debajo del 5% (datos no mostrados) dada su relativa alta frecuencia en la población; sin embargo, dada la baja frecuencia para cinco alelos encontrados, los valores de L se encontraron entre el 20 y 60%, indicando una baja probabilidad de encontrar éstos alelos en otras

poblaciones muestreadas (Tabla 5). La presencia de “alelos raros” o en bajas frecuencias es importante para la identificación y discriminación de materiales, pues se puede asignar estos alelos a alguna característica en particular (fenotípica, procedencia geográfica, entre otras), además, pueden ser de utilidad para una correcta genotipificación y discriminación de materiales seleccionados con características deseables.

Tabla 5. Valores de probabilidad de pérdida alélica (L) para alelos con bajas frecuencias en la población.

<b>Marcador</b>	<b>Alelo</b>	<b>Frecuencia</b>	<b>L</b>
FJ444930	<b><u>3</u></b>	<b><u>0.097</u></b>	<b><u>0.441</u></b>
FJ444929	1	0.181	0.203
FJ444932	3	0.118	0.366
FJ444931	4	0.139	0.302
FJ476076	<b><u>1</u></b>	<b><u>0.063</u></b>	<b><u>0.597</u></b>
	2	0.125	0.344

La frecuencia mínima alélica ( $P_a$ ) hace referencia a la mínima frecuencia con la cual se tiene la certeza de estimar una frecuencia alélica en particular y depende del tamaño muestral. El valor obtenido fue de 0,021, indicando que el número de materiales colectados y utilizados en el presente trabajo es adecuado y brinda un buen soporte a la estimación de las frecuencias alélicas más bajas obtenidas en el estudio (Tabla 5). Ninguno de los alelos encontrados con los nueve marcadores microsatélites evaluados tuvo frecuencias menores al valor obtenido de  $P_a$ .

La probabilidad de alelos nulos ( $r$ ), si es negativa o muy baja, puede considerarse que la presencia de una sola banda corresponde a un homocigoto y no a un heterocigoto con un alelo nulo. En la mayoría de los casos este valor resultó negativo a excepción del marcador FJ444935 en donde el valor fue positivo, pero muy bajo (0,035) (Tabla 6). Lo anterior brinda una alta confiabilidad para la lectura y asignación de genotipos a partir de los patrones de bandas obtenidos y confirma la posibilidad de que no se presentaron individuos heterocigotos con la presencia de alelos nulos. La determinación correcta de la presencia de alelos nulos es muy importante para análisis posteriores, dado que puede aumentarse la cantidad de homocigosis de manera equivocada y por lo tanto, afectar de gran manera los análisis de diferenciación, estructura poblacional y flujo genético.

El número efectivo de alelos (ENA) hace referencia a los alelos con capacidad de pasar a la siguiente generación (Kimura y Crow 1964) y resulta un buen indicador de los marcadores que realizan aportes importantes al estudio de la diversidad, en la medida que el valor de ENA se acerque al número de alelos encontrados. De esta manera, todos los marcadores utilizados en este estudio tuvieron valores de ENA cercanos al número de alelos, a excepción del marcador FJ444935, el cual no resultó muy informativo (Tabla 6). Según este criterio, los mejores marcadores fueron el FJ444931 y FJ444934, sin embargo, los restantes marcadores mostraron buenos valores de ENA y por lo tanto, son recomendables para estudios de diversidad genética en la especie.

Tabla 6. Número de alelos, frecuencia alélica mínima ( $P_a$ ), probabilidad de alelos nulos ( $r$ ) y número efectivo de alelos (ENA) estimado para los nueve marcadores microsatélites usados.

<b>Marcador</b>	<b>No. Alelos</b>	<b>(r)</b>	<b>No. Efectivo de alelos (ENA)</b>
FJ444930	3	-0.108	2.377
FJ444929	4	-0.118	2.776
FJ444932	3	-0.171	2.370
FJ476075	2	-0.069	1.607
FJ444934	3	-0.010	<b>2.855</b>
FJ444931	5	-0.086	<b>4.651</b>
FJ444936	3	-0.125	2.898
FJ444935	2	0.035	1.198
FJ476076	4	-0.194	2.874

#### 6.4.1 Prueba de neutralidad

La prueba de neutralidad de Ewens-Watterson permite decidir, en función de un modelo, si un locus se desvía de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad. Uno de estos modelos propone que la mayoría de variabilidad genética se mantiene por el efecto combinado de la presión de mutación y la deriva genética (neutralismo), por lo tanto, se han desarrollado varias pruebas estadísticas para comprobar si se cumple la teoría de la mutación neutral (Kimura 1968), que postula que todos los alelos son selectivamente neutrales. La mayoría de estas pruebas se basan en la teoría muestral de alelos neutrales desarrollada por Ewens (1972).

La prueba calcula un intervalo de confianza al 95% (L95-U95) del valor medio de la homocigosidad esperada bajo la hipótesis de neutralidad. Si el valor promedio

de la homocigosidad esperada según las proporciones Hardy-Weinberg se ubica dentro del intervalo, la prueba no es significativa y el locus en cuestión puede considerarse neutral. Si el promedio queda fuera del intervalo de confianza, entonces hay motivos para pensar que la selección podría estar actuando en el locus implicado (Caujapé, 2006).

Tabla 7. Prueba de neutralidad de Ewens-Watterson para los nueve marcadores microsatélites utilizados.

<b>Marcador</b>	<b>Promedio Homocigosidad</b>	<b>DS</b>	<b>L95</b>	<b>U95</b>
FJ444931	0.5721	0.0325	0.3166	0.9323
FJ444929	0.5884	0.0321	0.3197	0.9323
FJ476075	0.8232	0.0283	0.5024	0.9862
FJ444930	0.6948	0.0353	0.3822	0.9725
FJ444935	0.8154	0.0291	0.5024	0.9862
FJ444934	0.6812	0.0346	0.3693	0.9725
FJ444932	0.6920	0.0346	0.3699	0.9725
FJ444936	0.6875	0.0341	0.3728	0.9725
FJ476076	0.5929	0.0313	0.3148	0.9322

La prueba realizada usando el programa Arlequín versión 3.11 y con 10000 permutaciones se presenta en la Tabla 7. Los resultados mostraron que ninguno de los marcadores estuvo por fuera del rango para el valor de homocigosidad y por lo tanto, en este caso, todos los loci analizados podrían ser considerados neutrales. Lo anterior indica que los marcadores no están afectados por selección y por lo tanto, todos resultan adecuados para la realización del estudio de diversidad genética y estructura poblacional, brindando soporte y confianza a los resultados y conclusiones obtenidas a partir del análisis de datos.

#### **6.4.2 Equilibrio Hardy-Weinberg (HW)**

El teorema de Hardy-Weinberg es una formulación matemática que muestra que las frecuencias de los diferentes alelos en poblaciones ideales de tamaño infinito no cambian en el tiempo a menos que actúen fuerzas evolutivas y por lo tanto, la mayoría de inferencias sobre la diversificación de las poblaciones se realizan en base al sentido de las desviaciones de las frecuencias génicas observadas respecto de las esperadas bajo el equilibrio que define el teorema de HW (Caujapé 2006).

El teorema de HW funciona como una hipótesis nula y la genética de poblaciones consiste en gran medida en investigar qué factores provocan la desviación significativa de esta hipótesis nula en las poblaciones naturales de organismos. A pesar que las desviaciones de las condiciones del modelo de HW son muy frecuentes, a veces las proporciones HW se cumplen en (algunos loci) de algunos organismos, sin embargo, se debe hacer énfasis en el hecho de que si una población natural cumple las proporciones HW no implica directamente que esté en equilibrio HW. Afirmar que una población está en equilibrio HW implica el cumplimiento de todas las condiciones implícitas al modelo, mientras que la sola adecuación a las proporciones HW puede ser debida a factores aleatorios o relacionados con un mal muestreo.

De esta manera, uno o varios marcadores moleculares (loci) que se encuentren en equilibrio HW en la población no serán de mucha utilidad para el análisis de los factores (selección mutación, deriva, endogamia) que están actuando en esa determinada población. La prueba de equilibrio HW para los nueve marcadores microsatélites usados en este estudio y realizada mediante la prueba de Chi<sup>2</sup> (X<sup>2</sup>) para las desviaciones de las frecuencias génicas con respecto a lo esperado bajo el supuesto de HW se presenta en la Tabla 8.

Tabla 8. Resultados de la prueba de equilibrio HW para los 9 marcadores microsatélites evaluados.

<b>Marcador</b>	<b>X<sup>2</sup></b>	<b>HW</b>
FJ444931	24.64**	No
FJ444929	33.32**	No
FJ476075	4.62*	No
FJ444930	14.77**	No
FJ444935	4.62*	No
FJ444934	10.55*	No
FJ444932	36.04**	No
FJ444936	40.00**	No
FJ476076	45.65**	No

\*  $P(0.05 \leq \alpha \leq 0.001)$ , \*\*  $P(\alpha < 0.01)$

Los resultados mostraron que ninguno de los nueve marcadores utilizados se encontraba en equilibrio HW, resultado importante para la continuidad de los análisis de diversidad genética y estructura poblacional de los materiales evaluados y que corresponde a lo encontrado por Pérez-Galindo *et al.* (2006), en donde los mismos marcadores moleculares no se encontraron en equilibrio HW en 23 individuos de *G. angustifolia*. Dados los resultados obtenidos, se decidió no

eliminar ninguno de los marcadores del análisis, a pesar del bajo número de alelos encontrado con los marcadores FJ476075 y FJ444935 (dos para cada uno) (Tabla 6), ya que podrían brindar algún nivel de información adicional sobre los procesos y factores involucrados en la desviación del equilibrio HW en las poblaciones de *guadua* evaluadas.

#### **6.4.3 Desequilibrio de ligamiento (D)**

El desequilibrio en el ligamiento es la asociación no aleatoria de alelos en dos o más loci (no necesariamente en el mismo cromosoma). En poblaciones grandes con apareamiento aleatorio, se espera que los alelos de diferentes loci estén asociados al azar, es decir, que exhiban equilibrio en el ligamiento. Sin embargo, a veces se observa una desviación de las combinaciones aleatorias de las frecuencias génicas, las que se denominan como desequilibrio en el ligamiento y que puede estar causado por una gran variedad de fenómenos (azar, cuellos de botella, consanguinidad, estructura poblacional, selección, entre otras) (Caujapé 2006). Estas desviaciones de las frecuencias gaméticas observadas respecto de las esperadas en equilibrio se cuantifica mediante el parámetro de desequilibrio en el ligamiento (D) (Slatkin 1994).

La prueba de desequilibrio de ligamiento indicó un posible ligamiento entre los marcadores FJ476075 y FJ444935 (Anexo C), sin embargo, se decidió incluirlos en el estudio dado que no se encontraron en equilibrio HW (Tabla 8) y por lo tanto, podrían brindar alguna información adicional importante de las poblaciones evaluadas. Además, el análisis de un gran número de loci aumenta el poder de detección de estructura poblacional y diversidad genética porque cada locus contiene información, inicialmente independiente, sobre los niveles de deriva, mutación y migración que han afectado a la población de estudio.

Los siete marcadores restantes no presentaron desequilibrio en el ligamiento (Anexo C), resultado que acoplado con la prueba de equilibrio HW, aporta una gran confiabilidad en los marcadores utilizados y respalda los restantes análisis y conclusiones, además, corresponde a lo encontrado por Pérez-Galindo *et al.* (2006), en donde ninguno de los mismos nueve marcadores moleculares se encontraron en desequilibrio de ligamiento evaluados en 23 materiales de *G. angustifolia*. Si los loci analizados están ligados genéticamente, entonces esta información no es independiente y los resultados explicarían predominantemente al grupo de ligamiento, más que a la población de individuos en estudio.

#### 6.4.4 Contenido de información polimórfica (PIC)

El contenido de información polimórfica (PIC) se refiere a la medida de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Para un marcador genético se define como la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo, es decir, que se pueda deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus (Botstein *et al.* 1980). El PIC junto con ENA sirven para evaluar la utilidad de un determinado locus de un marcador molecular para distinguir entre los individuos analizados

El PIC ha sido ampliamente usado como un descriptor del grado de información que ofrece un determinado sitio del genoma (Torres 2008). Valores de PIC superiores a 0.5 indican loci altamente polimórficos, como es el caso de los marcadores FJ444929, FJ444934, FJ444936, FJ444931 y FJ476076, siendo los dos últimos quienes presentaron los valores más altos y por lo tanto los más informativos (0.7 y 0.63 respectivamente). Medianamente informativos los que presentan valores entre 0.25 y 0.5, como los marcadores FJ444930, FJ444932 y FJ476075 y poco informativos los de valores inferiores a 0.25. Según este descriptor, solo el marcador FJ444935 (0.152) resultó mono-mórfico y poco informativo para los materiales evaluados de *G. angustifolia* (Tabla 9).

Tabla 9. Contenido de información polimórfica (PIC) estimado para los nueve marcadores microsatélite evaluados.

Marcador	PIC
FJ444930	0.492
FJ444929	0.579
FJ444932	0.500
FJ476075	0.307
FJ444934	0.577
<b>FJ444931</b>	<b>0.700</b>
FJ444936	0.582
FJ444935	0.152
<b>FJ476076</b>	<b>0.643</b>

En investigaciones anteriores y usando los mismos marcadores microsatélites Torres *et al.* (2009) obtuvieron amplificación en ocho loci en *G. angustifolia* con valores de PIC entre 0.398 y 0.851, valores más altos que los obtenidos en esta investigación (entre 0.152 y 0.70) (Tabla 9). Muñoz (2011) obtuvo valores de PIC entre 0.133 y 0.62, muy similares a los reportados en esta investigación, usando los mismos marcadores microsatélites pero con un aumento de aproximadamente

30 individuos analizados en la zona cafetera Colombiana. Los valores altos obtenidos por Torres *et al.* (2009) pueden ser explicados por la inclusión en el análisis de materiales pertenecientes al Banco Nacional de *G. angustifolia* el cual posee representantes de todo el país, en donde pueden encontrarse otros alelos adicionales y diferentes a los reportados en esta investigación, los cuales contribuyan a aumentar los valores de PIC.

#### 6.4.5 Poder discriminante (Pd)

El poder discriminante (Pd) es una estimación de la probabilidad que dos accesiones muestreadas al azar puedan ser distinguidas por sus perfiles genéticos (alelos) en un determinado locus (Kirst *et al.* 2005). Para estimar el poder discriminante, se debe conocer el valor de la probabilidad de identidad (I), la cual puede ser un mejor estimativo del grado de información de un sitio del genoma obtenido por medio de los marcadores microsatélites en poblaciones, ya que ésta indica que tan alta es la probabilidad de encontrar dos individuos al azar iguales en un locus en particular y por tanto, que tan discriminante es ese sitio (*op cit*). Además, no se basa en ningún supuesto dado que es una probabilidad.

Tabla 10. Número de alelos, poder discriminante (Pd) y probabilidad de identidad (I) obtenidos para los nueve marcadores microsatélites usados.

<b>Marcador</b>	<b>No. Alelos</b>	<b>Pd</b>	<b>I</b>
FJ444930	3	0.741	0.259
FJ444929	4	0.807	0.193
FJ444932	3	0.740	0.260
FJ476075	2	0.539	0.461
FJ444934	3	0.801	0.199
FJ444931	5	0.872	0.128
FJ444936	3	0.805	0.195
FJ444935	2	0.279	0.721
FJ476076	4	0.809	0.191
<b>Combinado</b>		<b>0.999996</b>	<b>4.114 x 10<sup>-6</sup></b>

Entre más bajos sean los valores de I, más informativos son los sitios estudiados mediante los microsatélites. Según este índice, el marcador más informativo es el FJ444931 (0,128) seguido por el FJ476076 (0,191) y el menos informativo de los marcadores fue el FJ444935 (0,721) (Tabla 10). Dado que el valor de I depende del número de alelos para cada locus, los marcadores mas informativos presentaron el mayor numero de alelos, resultado que corrobora lo obtenido con los análisis anteriores (PIC y ENA).

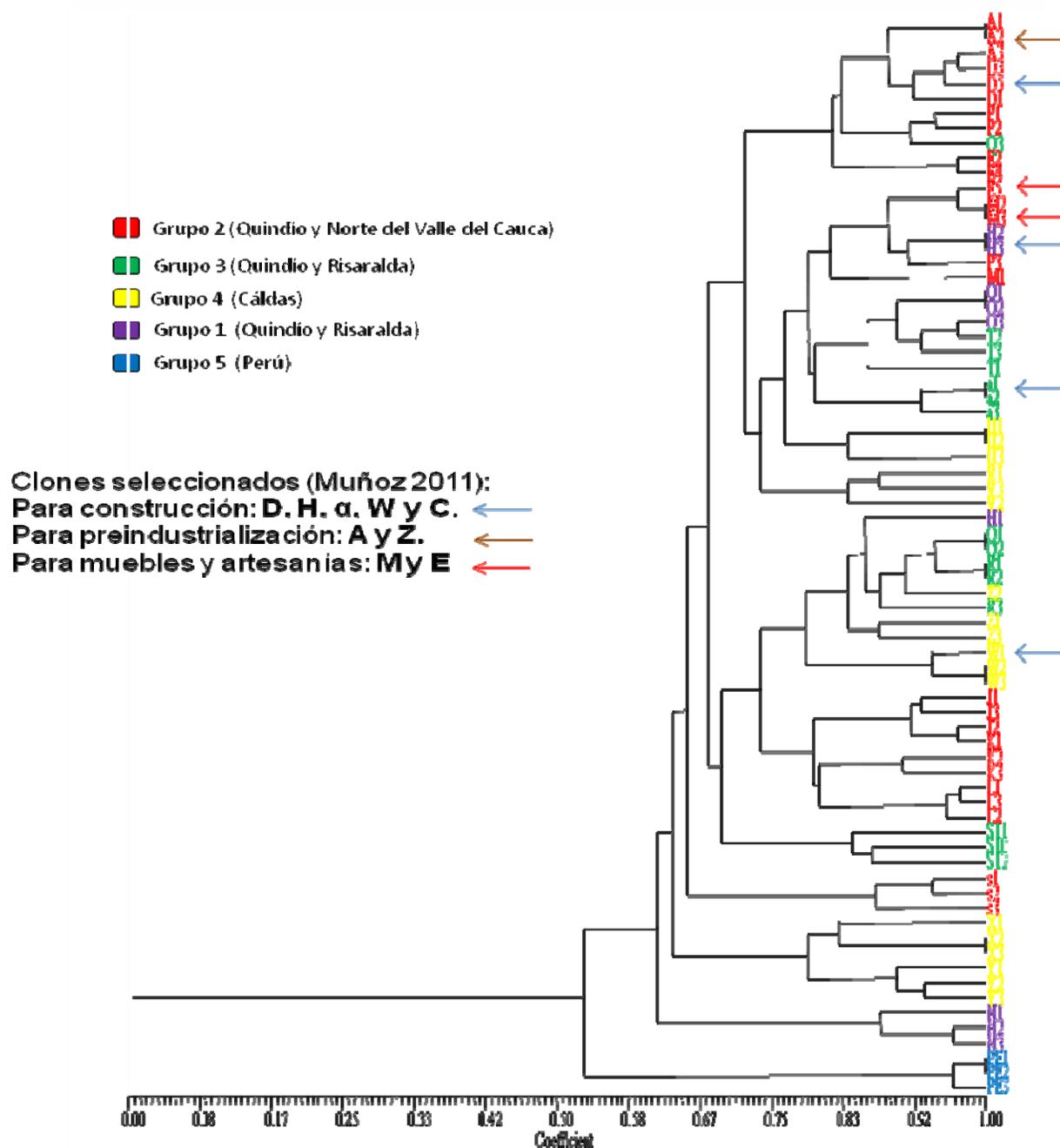
La probabilidad de identidad combinada permite evaluar que tan buena herramienta es el conjunto de los marcadores, en este caso, el valor de I combinada fue de  $4,114 \times 10^{-6}$ , indicando que utilizando los nueve marcadores analizados para las muestras evaluadas de *G. angustifolia* existe una probabilidad muy baja y cercana a cero de tomar dos individuos al azar que contengan el mismo genotipo y por lo tanto, son lo suficientemente informativos para estudiar la diversidad genética en el eje cafetero.

Dado que el Pd es la probabilidad de que dos accesiones muestreadas al azar puedan ser distinguidas por sus perfiles genéticos, el valor de Pd combinado fue de 0,999996 (Tabla 10), lo que indica que con una probabilidad de 99.9996% de exactitud, pueden diferenciarse los materiales evaluados. Al utilizar solo los dos marcadores FJ476076 y FJ444931, su Pd combinado es del 97.55%, indicando nuevamente que estos dos marcadores fueron muy buenos para revelar polimorfismo y diferenciar materiales en la población evaluada y por lo tanto, los sugiere como marcadores ideales para estudios de diversidad genética y estructura poblacional en *G. angustifolia*. De manera general, dado el bajo valor de Ic y alto nivel de Pd, se confirma lo propuesto por Pérez-Galindo *et al.* 2006 en donde sugieren el uso de estos nueve marcadores para estudios intra e inter poblacionales en *G. angustifolia*.

## 6.5 Análisis descriptivo

El análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA (Figura 11) mostró que no existe una relación entre los agrupamientos formados y las zonas geográficas de procedencia de los materiales colectados, sin embargo, a un nivel aproximado de similitud de 0.52, se logró diferenciar entre los materiales procedentes del Perú (a) (Figura 11) de los materiales del eje cafetero Colombiano, resultado que confirma lo encontrado por Muñoz (2011). Tampoco se observó un patrón claro de agrupamiento de los materiales con respecto a los biotipos establecidos morfológicamente, sin embargo, en algunos casos se observó una tendencia de formación de grupos entre aquellos materiales provenientes del mismo departamento (ubicados con el mismo color en la Figura 11), lo cual concuerda con los resultados obtenidos por Torres (2008) usando los mismos marcadores de este estudio y por Marulanda *et al.* (2007) quienes probaron microsatélites de arroz y caña de azúcar en diferentes accesiones de *G. angustifolia* y otras especies del género *Guadua*. Ellos tampoco lograron relacionar genéticamente los biotipos, pero si distinguieron variaciones intraespecíficas en *G. angustifolia* relacionadas con áreas distantes geográficamente, contrario a lo encontrado en esta investigación.

Figura 11. Dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA utilizando los datos de nueve marcadores microsatélites en 72 materiales de *G. angustifolia*.



De manera general, debido a la dispersión de los materiales en el gráfico y la ausencia de grupos relacionados con alguna característica especial, el dendrograma muestra variación entre los materiales de *G. angustifolia* evaluados, además, muestra variación al interior de cada uno de los sitios de colecta, lo que confirma los resultados de Muñoz (2011) quien encontró variación dentro de guaduales al utilizar nueve marcadores microsatélites en una muestra de 24 individuos en un mismo sitio de colecta o guadual. Este resultado indicó que a mayor distancia recorrida dentro del guadual mayor es la distancia genética entre los materiales, proponiendo que la variación es debida posiblemente por reproducción sexual y polinización cruzada eólica que se favorece en individuos cercanos geográficamente.

Con respecto a los materiales seleccionados en estudios previos (Muñoz 2011) por características sobresalientes y como clones superiores, se puede observar que gran parte de los materiales seleccionados se agrupan a un nivel de similitud de aproximadamente 0.78 y pertenecen principalmente al grupo 2 (Quindío y Valle del Cauca), lo que indica que esta zona geográfica del país es una fuente importante de variabilidad fenotípica utilizable en programas de selección y mejoramiento genético de la especie.

Para comprobar estadísticamente el tipo de relación existente entre los datos genéticos y los datos geográficos se realizó la prueba de Mantel, la cual es una metodología no paramétrica que permite evaluar la significancia de la correlación entre matrices de distancia. El valor obtenido para la prueba fue de (0,2), en donde el grado de ajuste puede interpretarse como muy bueno ( $0.9 < r$ ), bueno ( $0.8 < r < 0.9$ ), bajo ( $0.7 < r < 0.8$ ) o muy bajo ( $r < 0.7$ ) (Rohlf 1988). Lo anterior confirma los resultados obtenidos con el dendrograma (Figura 11), en donde se muestra que no existe relación entre los grupos genéticos formados con las procedencias geográficas de los materiales, es decir, los resultados permiten proponer que no hay relación entre las distancias genéticas con las distancias geográficas.

La falta de correspondencia entre grupos genéticos y geográficos, en algunos casos, pueden estar asociado a factores espacio temporales que afectan la dinámica poblacional, como la relación de la especie con los habitantes precolombinos que pudieron transportar material de una región a otra, a los eventos asociados a la colonización en el eje cafetero y en algunos casos a la migración de cepas o semillas por corrientes de agua, aves y otros animales (Muñoz 2011).



Los resultados obtenidos en esta investigación pueden explicarse por la inclusión en el análisis de varios individuos representantes de una población y no corresponde al análisis de un banco de germoplasma que posee escasos individuos representantes de una zona geográfica en particular. Por el contrario, los resultados de este estudio están de acuerdo a lo reportado por Potosí *et al* (2006), quienes evaluaron poblaciones naturales de *G. angustifolia* en la cuenca del río Cauca, encontrando una alta diversidad genética de los materiales evaluados. La presencia de una alta diversidad genética en los recursos silvestres y poblaciones naturales es de vital importancia, ya que constituye un reservorio de “variación” genética (alelos) que permiten la supervivencia de la especie y contiene información necesaria para afrontar cambios ambientales bióticos y abióticos, además, es el componente fundamental para la utilización de los recursos genéticos a través de programas de selección y mejoramiento genético.

### **6.5.2 Índices de diversidad genética: heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos**

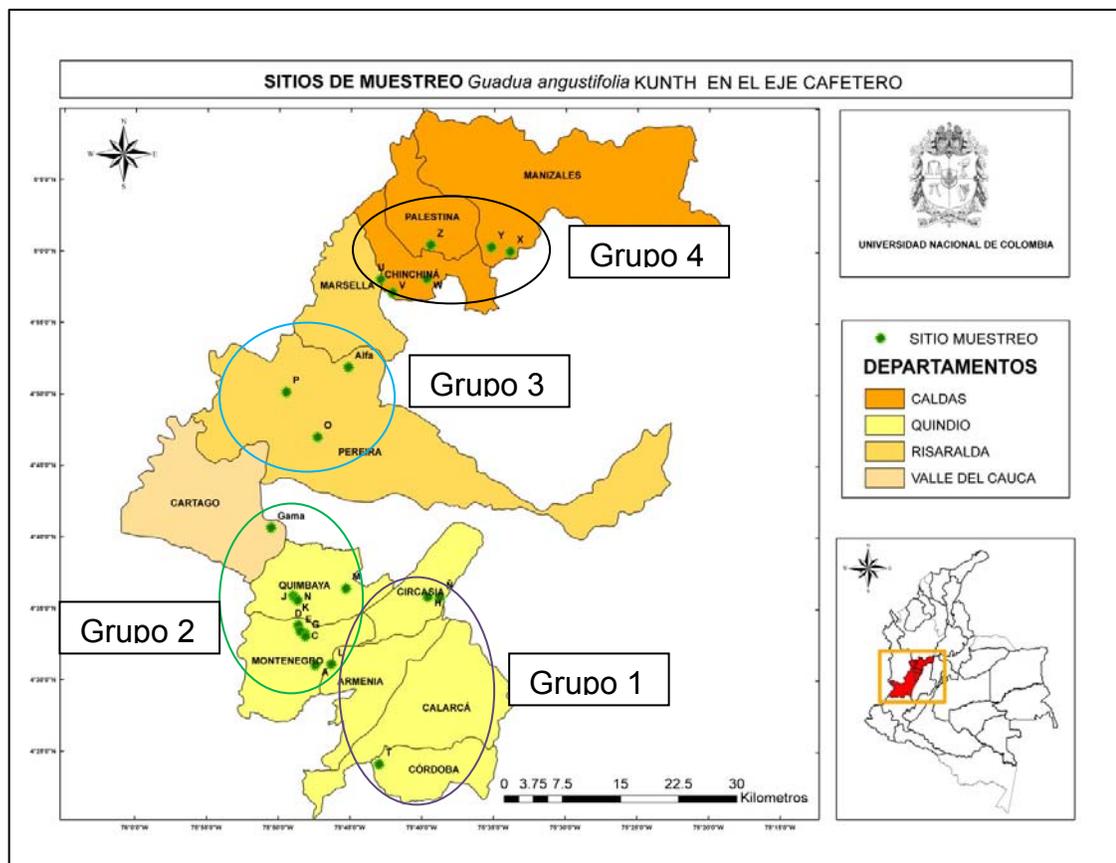
Todas las pruebas estadísticas sobre predicciones teóricas en genética de poblaciones (por ejemplo, la bondad de ajuste a las proporciones de Hardy-Weinberg) asumen que se describen adecuadamente las poblaciones o los grupos genéticos a evaluar y por lo tanto, la definición de sistemas poblacionales es una tarea que debe realizarse *a priori* y con base en el conocimiento que se tenga de la especie (Caujapé 2006). Los resultados del análisis discriminante permitieron re-ubicar los sitios H, N y O como un solo grupo de materiales (grupo 1) y el sitio T con una alta probabilidad de pertenecer al grupo 3 debido a su perfil genético, ubicado inicialmente en el grupo 1 por Rugeles (2011) (Figura 13) y basándose en cercanías geográficas. Además, Muñoz (2011) reporta que este sitio (T) corresponde a un centro experimental establecido de manera vegetativa con materiales procedentes del departamento de Risaralda y por lo tanto, hace parte del grupo de materiales de esa zona. De esta manera, los grupos para los posteriores análisis en este trabajo quedaron conformados como se describe en la Tabla 11 y serán discutidos con detalle en el aparte de diferenciación de las poblaciones.

Tabla 11. Grupos formados para el análisis de diversidad genética y estructura poblacional utilizando nueve marcadores moleculares microsátélites.

Grupo	Sitio	Departamento de procedencia
1	H, N, O	Quindío y Risaralda
2	A, D, E, J, K, L, M, Gama, P.	Quindío y Norte del Valle del Cauca
3	Q, R, S, T, Alfa	Quindío y Risaralda
4	U, V, W, X, Y, Z	Caldas
5	PE	Perú

La  $H_e$ , estima la probabilidad que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de una población sean diferentes, mientras que la  $H_o$ , hace referencia a la proporción de individuos heterocigotos presentes y observados en una muestra poblacional. Los valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y porcentaje de loci polimórficos (P) obtenidos en el presente estudio se presentan en la Tabla 12.

Figura 13. Grupos genéticos formados y analizados mediante marcadores moleculares RAMs en 23 sitios del Eje Cafetero Colombiano (Rugeles 2011).



Uno de los hallazgos importantes en esta investigación es la presencia de un valor de  $H_o$  que superó a la  $H_e$  en todos los grupos evaluados, indicando un exceso de heterocigotos observados con respecto a lo esperado bajo condiciones de HW, posiblemente debido a un proceso de selección que favorece la supervivencia de los individuos heterocigotos (Tabla 12). Además, los valores de  $H_o$  y  $H_e$  evaluados para toda la población y con cada uno de los marcadores utilizados también mostró valores superiores de  $H_o$  en ocho de los nueve marcadores utilizados ( Los valores de  $H_o$  y  $H_e$  obtenidos en este estudio fueron muy similares a los obtenidos por Muñoz (2011) tanto para los grupos genéticos, como para cada uno de los marcadores evaluados (datos no mostrados). Sin embargo, Muñoz (2011) evaluó 90 muestras del eje cafetero, lo que permite concluir que una disminución hasta 72 muestras como se planteó en este estudio no afectó los valores obtenidos y que un buen ejercicio de muestreo es indispensable para la obtención de resultados adecuados y confiables, además, se disminuyen los costos asociados del estudio por la inversión de menos recursos en los muestreos y análisis con marcadores moleculares.

Tabla 13). Estos resultados no coinciden con lo reportado por Perez-Galindo *et al.* (2009), en donde el valor de  $H_o$  es superior al valor de  $H_e$  en solo tres de nueve marcadores microsatélites evaluados, sin embargo, estos investigadores solo analizaron 23 individuos que posiblemente pueden explicar estos resultados. Los resultados tampoco están de acuerdo a lo reportado por Torres (2008), en donde tres de ocho marcadores microsatélites tuvieron valores de  $H_o$  mayores que  $H_e$  y en promedio, se observó un mayor número de homocigotos que de heterocigotos en los ocho loci. Sin embargo, estos resultados pueden explicarse por la evaluación de un banco de germoplasma con pocos representantes de poblaciones naturales.

Tabla 12. Valores de heterocigosidad esperada ( $H_e$ ), heterocigosidad observada ( $H_o$ ) y porcentaje de loci polimórficos (P) para 5 grupos formados y utilizando los datos obtenidos con nueve marcadores moleculares microsatélites.

<b>Grupo</b>	<b>He</b>	<b>Ho</b>	<b>P(%)</b>
<b>1</b>	0.505	0.728	88.88
<b>2</b>	0.526	0.728	88.88
<b>3</b>	0.533	0.726	100
<b>4</b>	0.544	0.697	100
<b>5</b>	0.326	0.518	55.5

Los valores de  $H_o$  y  $H_e$  obtenidos en este estudio fueron muy similares a los obtenidos por Muñoz (2011) tanto para los grupos genéticos, como para cada uno de los marcadores evaluados (datos no mostrados). Sin embargo, Muñoz (2011) evaluó 90 muestras del eje cafetero, lo que permite concluir que una disminución hasta 72 muestras como se planteó en este estudio no afectó los valores obtenidos y que un buen ejercicio de muestreo es indispensable para la obtención de resultados adecuados y confiables, además, se disminuyen los costos asociados del estudio por la inversión de menos recursos en los muestreos y análisis con marcadores moleculares.

Tabla 13. Valores de  $H_o$  y  $H_e$  evaluados para toda la población y con cada uno de los marcadores microsatélites utilizados

<b>Marcador</b>	<b><math>H_o</math></b>	<b><math>H_e</math></b>
FJ444930	0.750	0.579
FJ444929	0.833	0.640
FJ444932	0.847	0.578
FJ476075	0.472	0.378
FJ444934	0.667	0.650
FJ444931	0.875	0.726
FJ444936	0.861	0.655
FJ444935	0.125	0.165
FJ476076	0.972	0.652

El marcador FJ444935 mostró el único valor de  $H_o$  menor que  $H_e$ , sin embargo, este marcador presento un bajo número de alelos, bajo valor de ENA, PIC, Pd e I; por lo que no resulta muy confiable la información suministrada por este marcador.

Los valores de  $H_e$  para todos los grupos fue muy similar y estuvo alrededor de 0.5 (Tabla 12), a excepción del grupo con los materiales procedentes de Perú, lo que se explica posiblemente por el bajo número de muestras evaluadas para ese grupo, sin embargo, deben realizarse estudios adicionales con materiales provenientes de esta zona para confirmar lo propuesto. La  $H_e$  promedio para toda la población fue de 0.56, indicando una alta diversidad genética de los materiales evaluados. Este valor está de acuerdo a reportes anteriores, donde se propone alta diversidad genética para poblaciones naturales usando otros marcadores moleculares (Potosí et al. 2006; Rugeles 2011), además, muy cercano al valor

obtenido por Muñoz (2011) (0.54) utilizando los mismos marcadores, pero aumentando el tamaño poblacional evaluado.

Otros estudios en bancos de germoplasma de guadua y usando marcadores microsatélites reportan la presencia de algunas accesiones distantes de las demás, indicando una gran diferenciación genética de éstas respecto al resto y por lo tanto, se explica el alto valor de diversidad obtenido a través de la He (0.6227) (Torres 2008).

El porcentaje de loci polimórficos (P) obtenido en este estudio estuvo entre 88.88 y 100% para los grupos del eje cafetero y 55.5% para los materiales de Perú (Tabla 12), indicando una alta diversidad genética de la población evaluada, además, estos valores fueron iguales a los encontrados en estudios anteriores (Muñoz 2011b), lo que confirma que la realización de un buen ejercicio de muestreo y la identificación adecuada de los grupos a evaluar permite la disminución en el número de muestras evaluadas sin afectar los resultados obtenidos (Caujapé 2006). Otros estudios de diversidad genética en guadua utilizando materiales del eje cafetero y marcadores moleculares dominantes (RAMs) (Rugeles 2011) reportan valores de P entre 42.5 y 77%, indicando que el análisis mediante marcadores moleculares microsatélites puede revelar más cantidad de polimorfismo indispensable para la diferenciación e identificación precisa de los materiales evaluados y por lo tanto, resulta complementario al análisis realizado mediante otro tipo de marcadores.

### 6.5.3 Consanguinidad (F)

La consanguinidad es la probabilidad de que los dos alelos de un gen de un individuo diploide sean idénticos por descendencia. También puede ser definida como la proporción probable de los loci de un individuo que contienen genes que son idénticos por descendencia.

Tabla 14. Valores obtenidos de consanguinidad (F) obtenidos por cada uno de los marcadores y su promedio.

<b>Marcador</b>	<b>F</b>
FJ444930	0.228
FJ444929	0.232
FJ444932	0.318
FJ476075	0.200
FJ444934	0.025
FJ444931	0.170
FJ444936	0.239

FJ444935	-0.323
FJ476076	0.329
<b>Promedio</b>	<b>0.158</b>

Los valores obtenidos de F por cada uno de los marcadores y el promedio se describen en la Tabla 14. Estos resultados indican que debido al exceso de heterocigotos observados (alto valor de  $H_o$ ) en las poblaciones por encima de la  $H_e$ , el valor de F se aumenta y por lo tanto, a pesar de la diversidad encontrada en la población, el efecto de la deriva y la selección en poblaciones pequeñas puede llevar a niveles altos de consanguinidad. Las mayores amenazas para el mantenimiento de la viabilidad de poblaciones de especies en peligro son la pérdida de variabilidad por efecto de la deriva genética y los efectos deletéreos de la consanguinidad. Estos valores de consanguinidad pueden ser explicados por la reproducción vegetativa, la cual es el tipo de reproducción predominante en la especie.

Tabla 15. Valores de F para cada uno de los grupos evaluados y estimados a partir de los datos combinados de nueve marcadores microsatélites.

<b>Grupo</b>	<b>F</b>
1	0.31
2	0.28
3	0.27
4	0.22
5	0.37

Los valores de F obtenidos para cada uno de los grupos estuvo entre 0.22 y 0.37 (Los valores obtenidos de F por cada uno de los marcadores y el promedio se describen en la Tabla 14. Estos resultados indican que debido al exceso de heterocigotos observados (alto valor de  $H_o$ ) en las poblaciones por encima de la  $H_e$ , el valor de F se aumenta y por lo tanto, a pesar de la diversidad encontrada en la población, el efecto de la deriva y la selección en poblaciones pequeñas puede llevar a niveles altos de consanguinidad. Las mayores amenazas para el mantenimiento de la viabilidad de poblaciones de especies en peligro son la pérdida de variabilidad por efecto de la deriva genética y los efectos deletéreos de la consanguinidad. Estos valores de consanguinidad pueden ser explicados por la reproducción vegetativa, la cual es el tipo de reproducción predominante en la especie.

Tabla 15). El valor alto obtenido para los materiales provenientes de Perú (grupo 5) (0.37) puede ser explicado por el bajo número de individuos evaluados al igual que para el grupo 1 (0.31). De manera general, los valores de consanguinidad obtenidos no fueron altos comparados con los obtenidos por Perez-Galindo *et al.* (2006), en donde se obtuvieron valores de hasta 0.38, sin embargo, debe tenerse especial cuidado para realizar comparaciones, dado que a efectos de evaluación comparativa de los niveles de variabilidad y consanguinidad en poblaciones pequeñas, es indispensable incluir en el análisis poblaciones del mismo género o especie, pero ampliamente distribuidas (Hedrick 2002).

## 6.6 Diferenciación de las poblaciones

Los estadísticos de Wright (1931) miden la estructuración genética a diferentes niveles espaciales, por ejemplo en un conjunto de poblaciones de una misma especie o una población dividida en varias sub-poblaciones.

Tabla 16. Valores de Fit, Fst y Fis obtenidos para cada uno de los nueve marcadores microsatélites utilizados y valor total para la población evaluada.

<b>Marcador</b>	<b>Fit</b>	<b>Fst</b>	<b>Fis</b>
FJ444930	-0.248	0.151	-0.469
FJ444929	-0.275	0.091	-0.403
FJ444932	-0.454	0.044	-0.521
FJ476075	-0.252	0.002	-0.255
FJ444934	0.022	0.187	-0.202
FJ444931	-0.180	0.089	-0.341
FJ444936	-0.292	0.079	-0.402
FJ444935	0.287	0.218	0.089
FJ476076	-0.470	0.071	-0.581
<b>Total</b>	<b>-0.246</b>	<b>0.099</b>	<b>-0.383</b>
<b>DS</b>	<b>0.060</b>	<b>0.018</b>	<b>0.048</b>

DS: Desviación estándar;  $\alpha=0,05$ ; 10000 permutaciones.

### 6.6.1 Fst

El Fst cuantifica la consanguinidad de las sub-poblaciones en relación a la población total de la cual forman parte, se interpreta como la proporción de la variación total atribuible a la diferenciación entre poblaciones (Caujapé, 2006). El valor de Fst encontrado en este estudio fue de 0.099 (DS=0.018; 10000 replicaciones) (Tabla 16) lo que indica que existe una baja o moderada diferenciación genética de los grupos (Tabla 17) (Wright 1978). Los resultados obtenidos son muy similares a los únicos valores reportados de Fst para el eje cafetero Colombiano, en donde usando marcadores moleculares RAMs se obtuvo un valor de 0.1047 (Rugeles 2011), indicando que ambos marcadores moleculares permiten la detección de estructura poblacional. Al usar marcadores moleculares microsatélites se obtuvo un valor de 0,093 (Muñoz 2011) y por lo tanto, se reporta una moderada diferenciación genética que confirma los resultados obtenidos en este estudio.

Dado que todas las pruebas estadísticas sobre predicciones teóricas en genética de poblaciones asumen que se describe adecuadamente las poblaciones o sistemas poblacionales, se realizó una prueba Exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995) (Anexo F) para verificar la significancia del valor de Fst obtenido y la correspondencia de los grupos formados. Los resultados obtenidos (Tabla 18) indicaron que el valor de Fst obtenido es altamente significativo ( $\alpha < 0.01$ ) y confirma que dentro de la población evaluada y compuesta por 23 sitios diferentes del eje cafetero Colombiano existe moderada subdivisión o estructura genética.

Tabla 17. Escala de valores de Fst y grados de diferenciación propuestos por Wright 1978.

<b>Valor de Fst</b>	<b>Grado de diferenciación</b>
0 - 0.05	Poca diferenciación genética
0.06 - 0.15	Moderada diferenciación genética
0.16 – 0.25	Alta diferenciación genética
Mayor de 0.25	Gran diferenciación genética

Las poblaciones naturales de organismos muestran casi siempre diferencias de frecuencias génicas y genotípicas en el espacio geográfico. Si esas diferencias llegan al extremo de ser significativas y las sub-poblaciones no intercambian genes (en forma de migrantes, o granos de polen que fecunden a individuos de otras sub-poblaciones), entonces cada una de ellas puede evolucionar independientemente y con el tiempo dar lugar a nuevas especies. Verificar la existencia de estructura genética poblacional es importante porque en ese caso las poblaciones pueden diversificar y diferenciarse genéticamente. En el caso de

los grupos evaluados en la zona geográfica de estudio (Figura 14), se encontró una moderada diferenciación genética, lo que indica que muy posiblemente existe un grado de flujo genético entre las poblaciones de esta zona y por lo tanto, no existen barreras ni marcada diferencia entre las poblaciones. Lo anterior puede ser posiblemente explicado por el transporte de materiales asociados con actividades humanas, polinización cruzada natural, o por eventos asociados a la colonización en el eje cafetero y en algunos casos a la migración de cepas o semillas por corrientes de agua, aves y otros animales (Muñoz 2011). A pesar que los resultados fueron significativos y se determinó una moderada diferenciación genética, los resultados bajos de correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas indican poca asociación entre estas distancias. Por lo tanto, el conjunto de resultados no son evidencia suficiente para proponer una estructuración poblacional asociada a ubicaciones geográficas.

Tabla 18. Matriz combinada de probabilidades (p) para cada par de comparaciones obtenida mediante la prueba Exacta de diferenciación poblacional (Raymond y Rousset 1995).

<b>Grupos</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>
<b>1</b>	*****				
<b>2</b>	0.0000	*****			
<b>3</b>	0,0087	0.0000	*****		
<b>4</b>	0.0000	0.0000	0.0000	*****	
<b>5</b>	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	*****

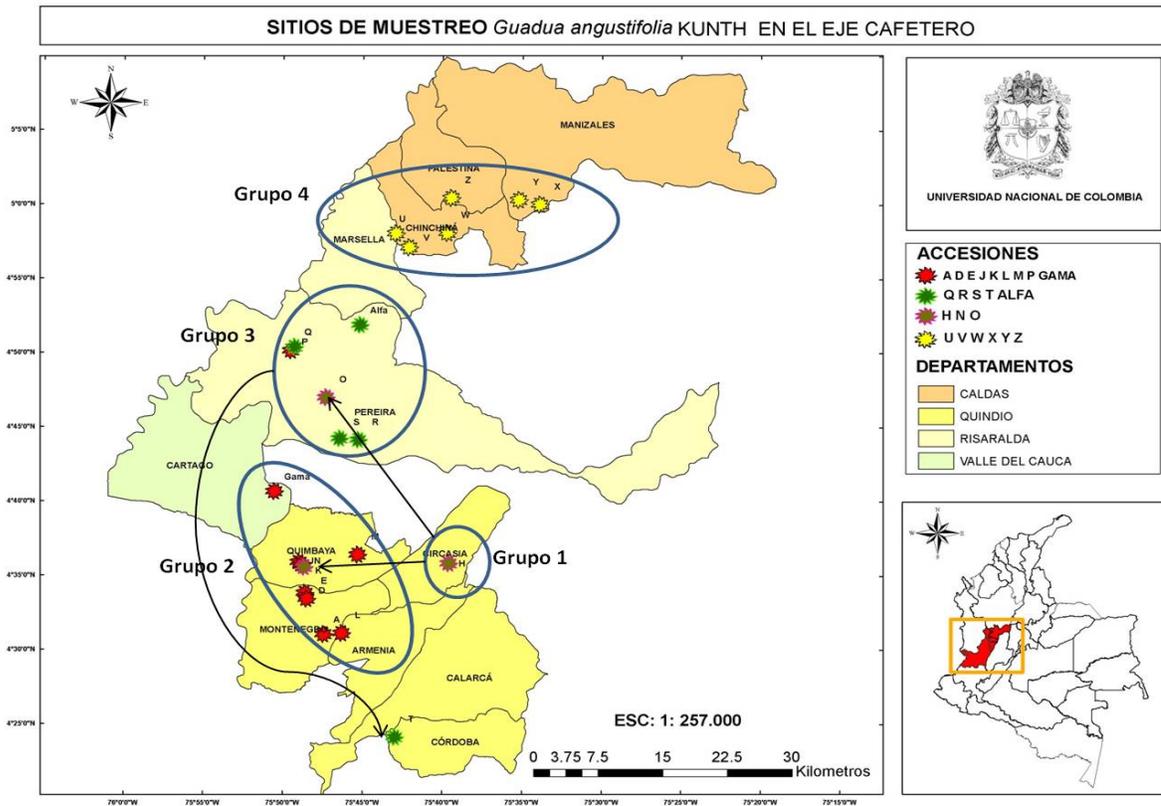
### 6.6.2 Fis

El índice de fijación (Fis) cuantifica la consanguinidad de los individuos en relación a las sub-poblaciones a las que pertenecen. Este parámetro también se conoce

como coeficiente de consanguinidad, porque ofrece una medida de la reducción de heterocigosidad de un individuo debida al apareamiento consanguíneo no aleatorio dentro de una población. Aunque Fis se calcula para cada locus analizado, su valor operativo es la media a través de los loci (Caujapé 2006).

El valor promedio de Fis estimado con los datos obtenidos con los nueve marcadores microsatélites evaluados fue de -0,383 (Tabla 16), valor que también resultó negativo para ocho de los nueve marcadores. Este valor es muy similar a lo reportado por Muñoz (2011) en donde se obtuvo un valor de -0,332 para 30 sitios del eje cafetero y valor negativo para siete de nueve marcadores evaluados.

Figura 14. Grupos formados para el análisis de diversidad genética y estructura poblacional de 69 materiales de *G. angustifolia*, basados en cercanía geográfica y soportado por un análisis discriminante mediante el programa SAS versión 9.11.



Elaboró: Ing. Adriana Martínez Arias ©

Según Wright (1931), los valores de Fis pueden tomar los siguientes valores:

Si el valor de Fis es positivo, las poblaciones tienen un defecto de heterocigotos, el cual puede ser debido a la consanguinidad o a la selección, además, puede explicarse por la presencia de alelos nulos que den la impresión falsa de defecto de heterocigotos, consanguinidad o efecto Wahlund, es decir, por la existencia de estructura poblacional que no se ha tenido en cuenta.

Si las poblaciones están en equilibrio HW, entonces la He de las sub-poblaciones será igual a la Ho y por lo tanto, el valor de Fis será igual a cero.

Si el valor de Fis es negativo, las poblaciones presentan un exceso de heterocigotos, que puede ser explicado por una inmigración importante conducente a la heterogamia, selección a favor de individuos heterocigotos

(selección sobredominante), reproducción cruzada obligada o algún mecanismo de autoincompatibilidad en la reproducción sexual de la especie. El Fis es el único parámetro de estructuración poblacional que interviene en el cálculo de la tasa de reproducción cruzada, el cual será discutido más adelante en el texto.

El exceso de heterocigotos encontrado en los grupos indica que pueden existir factores que favorecen la polinización cruzada. La flor de la guadua es completa, presenta anteras y estructura femenina en un mismo flósculo y el polen es viable, sin embargo, el estigma se ubica de manera que impide la autofecundación, además, podría considerarse que existe autoincompatibilidad, pero deben realizarse estudios más detallados para conocer con exactitud la causa o causas genéticas que originan el exceso de heterocigotos (Muñoz 2011). Dados los resultados anteriores, es altamente recomendable el desarrollo de estudios más detallados de biología floral y reproductiva en la especie, acompañados de estudios citogenéticos para dilucidar los mecanismos que expliquen el exceso de heterocigotos.

### **6.6.3 Fit**

El Fit cuantifica la proporción de variación atribuible a la diferenciación inter-individual y mide la reducción de heterocigosidad de un individuo en relación al total de poblaciones (Caujapé 2006). Este parámetro cuantifica la consanguinidad de los individuos en relación a la población total de la que forman parte. Puede considerarse la medida más global de consanguinidad, puesto que tiene en cuenta los efectos del apareamiento no-aleatorio dentro de las sub-poblaciones y el efecto de la subdivisión poblacional.

El valor obtenido en este estudio fue de -0.246 (Tabla 16), resultado muy similar al obtenido por Muñoz (2011) de -0.211. No se han reportado valores de este estimador en ninguna de las investigaciones realizadas en diversidad genética en *G. angustifolia* y por lo tanto, el único valor de referencia es el reportado anteriormente. Nuevamente, este valor confirma los resultados obtenidos con el Fis, en donde se observa un marcado aumento del número de heterocigotos con respecto a lo esperado bajo condiciones de HW y propone máxima alogamia en la especie.

## **6.7 Distancia genética**

A pesar que los valores de distancia genética calculados con el índice de Nei (1978) (Tabla 19) no fueron muy altos comparados con otros estudios de diversidad genética en *G. angustifolia* (Potosí *et al.* 2006; Torres 2008), la mayor distancia genética fue para los grupos 4 y 5 (0.226) seguido por los grupos 3 y 5

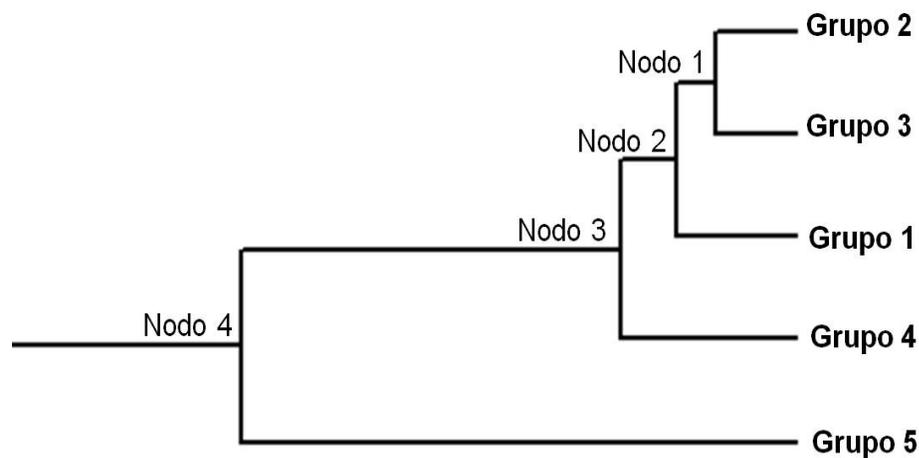
(0,165) y 1 y 5 (0.165); resultado que puede explicarse por la distancia geográfica alta entre los materiales del grupo 5 procedentes del Perú, con los materiales de Colombia (grupos 1, 2, 3 y 4). De manera general, el grupo 5 presentó la mayor distancia con respecto a los materiales colombianos, resultado que confirma lo obtenido mediante el análisis descriptivo y de acuerdo a lo obtenido por Muñoz (2011), donde los materiales de esa zona geográfica pudieron ser discriminados mediante el análisis.

La distancia más baja fue para los grupos 1 y 3 (0,016), seguida por los grupos 2 y 3 (0.016) y 1 y 2 (0.033), lo que puede ser explicado por varios factores como la cercanía geográfica entre los materiales de esos grupos que facilita el intercambio o flujo genético entre grupos. Además, propone una alta cohesión entre los materiales procedentes del eje cafetero Colombiano descrita en estudios previos (Rugeles 2011; Muñoz 2011).

Tabla 19. Distancias genéticas obtenidas mediante el índice de Nei (1978) para los cinco grupos evaluados de *G. angustifolia*.

	1	2	3	4	5
1	*****				
2	0,033	*****			
3	0,0144	0,016	*****		
4	0,0568	0,0509	0,0394	*****	
5	0,1649	0,1342	0,1651	0,2261	*****

Figura 15. Dendrograma para los cinco grupos evaluados y construido mediante el método UPGMA con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones usando el programa TFPGA.



El dendrograma para los cinco grupos construido mediante el método UPGMA y con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones (Figura 15) mostró un alto porcentaje de loci que soportan la formación de los nodos (Tabla 20) lo que indica una alta confiabilidad para los loci utilizados en el análisis de diversidad genética los materiales colectados y la efectividad de los marcadores moleculares microsatélites para el estudio realizado.

Tabla 20. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los cuatro grupos formados.

<b>Nodo</b>	<b>Proporción de réplicas similares (1000 repeticiones)</b>	<b>% total de loci que soportan el nodo</b>
1	64.80%	61.97%
2	80.90%	56.34%
3	99.80%	74.18%
4	100%	100%

El dendrograma con los cinco grupos confirma que los materiales Colombianos forman un grupo del cual pueden discriminarse fácilmente los materiales procedentes del Perú (grupo 5). Además, confirma que no existe una relación clara entre distancias genéticas y distancias geográficas, dado que la menor distancia genética fue encontrada en los grupos 1 y 3, sin embargo, estos grupos no presentaron la menor distancia geográfica. Además, el grupo 4 estuvo conformado por materiales no cercanos geográficamente (sitios H, N, O) pertenecientes a los departamentos de Quindío y Risaralda.

De los grupos Colombianos, el grupo 4 fue el más alejado de los grupos 1, 2 y 3; (Figura 15), lo que puede ser explicado por la distancia geográfica entre ellos. Estos resultados pueden resultar contradictorios y es recomendable realizar estudios de diversidad genética en la especie, en donde se incluyan materiales representativos de poblaciones naturales y colectados en diferentes zonas del país.

## **6.8 Análisis de varianza molecular AMOVA**

Este análisis fue usado para verificar el porcentaje de la variación que es atribuible a la variación entre los grupos, dentro de los grupos y la variación individual dentro

de grupos. Los resultados del AMOVA (Tabla 21) indicaron que el mayor porcentaje de variación corresponde a diferencias propias de los individuos (90.17%) seguido por la variación encontrada entre los grupos formados (9.83%). La variación de individuos dentro de grupos fue negativa y por lo tanto es considerada como cero, además, no resultó significativa y por lo tanto, permite concluir que no existió variación individual dentro de cada grupo formado. Los resultados obtenidos están de acuerdo a lo reportado en estudios anteriores, donde la variación entre poblaciones fue el 7.15% de la variación total, entre individuos dentro de poblaciones la estimación de varianza dio un valor negativo por lo que se considera cero y el resto de la variación se debió a la varianza dentro de individuos (Muñoz 2011).

Tabla 21. Análisis de varianza molecular (AMOVA) para los cinco grupos formados y utilizando los datos obtenidos de nueve marcadores microsatélites.

Fuente de variación	GL	SC	Comp. Varianza	Porcentaje de variación
Entre grupos	4	32.524	0.253*	9.83%
Entre individuos dentro de grupos	67	95.844	0	0
Dentro de individuos	72	231	3.215*	90.17%

\*Significativo para  $\alpha=0,05$ ; 1000 permutaciones

## 6.9 Tasa de reproducción cruzada (t)

El índice de alogamia o tasa de reproducción cruzada (*outcrossing*) (t) (Weir y Cockerham 1984), estimada basada en los índices de fijación de Wright (1951) fue de 2.24 indicando un exceso de heterocigotos y sugiere una fuerte alogamia en la especie.

La tasa de reproducción cruzada es una transformación del valor del índice de fijación (Fis) que estima el grado de intercambio genético intra-poblacional. El movimiento de genes dentro del espacio poblacional se relaciona especialmente con el sistema reproductivo de los organismos y presenta implicaciones para la tasa de consanguinidad en una población natural. En la mayoría de poblaciones naturales no se presenta panmixia; no obstante, cuando la incidencia de apareamientos consanguíneos es elevada, entonces las condiciones del equilibrio HW se alteran de manera que las proporciones de homocigotos observadas son mayores que las proporciones esperadas. Este fenómeno se produciría aunque todos los apareamientos consanguíneos se dieran entre individuos heterocigotos,

ya que en este caso (asumiendo ausencia de selección) la proporción de heterocigotos esperada en la siguiente generación siempre sería la mitad de la existente en la generación parental (Caujapé 2006).

Dada la ecuación para la determinación de la tasa de reproducción cruzada  $t = \frac{1 - F_{is}}{1 + F_{is}}$ , donde  $F_{is}$  = índice de fijación; los valores que pueden obtenerse para  $t$  serían:

Si todos los individuos son homocigotos, entonces  $F_{is}=1$ . Por lo tanto,  $t=0$ ; indicando ausencia de alogamia o reproducción cruzada y una posible consanguinidad elevada en la población.

Si existen apareamientos completamente aleatorios, entonces  $F_{is}=0$ . Por lo tanto,  $t=1$ ; lo que indica la máxima alogamia de la especie e indica reproducción cruzada entre los individuos de la población.

Si existe exceso de heterocigotos, como se ha planteado en esta investigación y reportado por otros autores (Muñoz 2011), entonces  $F_{is}<0$ . Por lo tanto,  $t>1$ , lo que confirma la presencia de individuos heterocigotos en exceso.

Teniendo en cuenta la interpretación de este índice, una población se aproxima al apareamiento aleatorio a medida que el valor de  $t$  se acerca a 1. El valor encontrado ( $t=2.24$ ) se aleja de 1, lo que permite concluir que en las poblaciones estudiadas no se presentan apareamientos completamente aleatorios, lo cual puede ser explicado, además de los aspectos ya discutidos en el texto, por el tipo de reproducción y multiplicación predominante en la especie (reproducción vegetativa) y el establecimiento de guaduales en diferentes zonas por actividades humanas, lo que afecta la aleatoriedad de los cruzamientos y aumenta el flujo génico, aspecto que será discutido en el siguiente aparte del texto. Además, este valor indica máxima alogamia, sin embargo, el exceso de heterocigotos permite proponer algún sistema de autoincompatibilidad de la especie, en donde se seleccionan a favor los individuos heterocigotos, selección que nuevamente afecta la aleatoriedad de los cruzamientos.

A pesar de que el tipo de reproducción predominante en guadua es la reproducción vegetativa, Muñoz (2011) encontró una alta variación genética dentro de los guaduales. Esta variación se explica posiblemente por la presencia de individuos dentro del guadual provenientes de semilla sexual, lo cual es confirmado por hallazgos recientes, en donde se propone que la guadua florece generalmente dos veces al año y de manera abundante (*op cit*). Otro factor que explica la presencia de individuos heterocigotos y propone fuerte alogamia para la especie es la estructura floral de la guadua (Figura 16). La inflorescencia es un conjunto de pseudo-espiguillas. Cada pseudo-espiguilla está conformada por

múltiples flósculos. Al interior de un flósculo, el gineceo está conformado por un estilo que termina en tres estigmas plumosos; el androceo está conformado por 6 estambres cuyos filamentos son muy largos y cuelgan por debajo de los estigmas dificultando la autofecundación y favoreciendo la alogamia (presencia de individuos heterocigotos).

Figura 16. Flor de *G. angustifolia*. Nótese los seis estambres que cuelgan por debajo de los estigmas plumosos.



Foto: Paula Rugeles ©

Los resultados de esta investigación corresponden con lo planteado por Muñoz (2011), en donde el exceso de heterocigotos puede ser explicado debido a la existencia de algún tipo de incompatibilidad genética (esporofítica o gametofítica), sin embargo, deben realizarse estudios más detallados, posiblemente usando los microsatélites de este estudio, donde se comparen plantas provenientes de semilla sexual con sus respectivas plantas madre, además, estudios de biología floral y citogenéticos, con el fin de explicar de manera más clara el exceso de heterocigotos y el posible caso de autoincompatibilidad que explicaría el exceso de heterocigotos.

## 6.10 Flujo genético entre las poblaciones

El movimiento de genes fuera del espacio poblacional como consecuencia de la dispersión de gametos (polen), cigotos (semillas) o individuos, afecta a muchas propiedades ecológicas y evolutivas de los organismos. Entre ellas, quizás la más importante sea la integridad de la especie, ya que el flujo génico contrarresta la divergencia que puede llevar al aislamiento reproductivo que da lugar a la especiación (Whitlock y Mccauley 1999).

Como se disponía de neutralidad en los marcadores utilizados y la presencia de varios alelos para los loci evaluados, se estimó el número de migrantes ( $Nm$ ) obteniéndose un valor de 2.28, el cual hace referencia al promedio de individuos que intercambian dos o más poblaciones en una generación.

Como norma se establece que valores de  $Nm$  mayores de 1 son típicos de especies con elevado flujo génico y por lo tanto, a mayores valores de  $Nm$ , mayores niveles de flujo génico; que en ausencia de fuerzas opositoras (como ciertas formas de selección natural), tenderán a volverse genéticamente homogéneas. La acción de esas posibles fuerzas opositoras debe evaluarse con cuidado, ya que pueden mantener la diferenciación poblacional pese a la existencia de niveles elevados de flujo génico.

Los resultados indican que las poblaciones del eje cafetero presentan un elevado flujo genético ( $Nm=2.28$ ) y por lo tanto explica los resultados obtenidos mediante análisis anteriores, como el valor bajo de  $F_{st}$  (diferenciación poblacional) y las bajas distancias genéticas entre los grupos del eje cafetero Colombiano. Cualquier nivel de flujo génico entre poblaciones impedirá una diferenciación completa entre ellas y por lo tanto, mantendrá los grupos bajo una relativa homogeneidad. Sin embargo, el flujo génico ha de sobrepasar ciertos niveles para evitar la diferenciación debida a la deriva genética (Wright 1931). Según Slatkin (1987), la estimación de  $Nm$  es valiosa precisamente porque da una idea de la fuerza relativa del flujo génico y la deriva genética, de manera que la deriva resultará en diferenciación genética local si  $Nm < 1$ , pero no si  $Nm > 1$ .

Por lo anterior, se podría concluir que hasta el momento, el efecto de la deriva en los grupos del eje cafetero no ha tenido la magnitud suficiente para causar una fuerte diferenciación poblacional e iniciar procesos de evolución independiente en los grupos evaluados dado que si el flujo génico es poco frecuente ( $Nm < 1$ ), las poblaciones tenderán a perder la cohesión genética y a evolucionar de manera independiente (Slatkin 1987). Sin embargo, esto no siempre es aplicable a las poblaciones de organismos, pues la selección natural puede producir adaptaciones a condiciones locales y diferenciación evolutiva incluso en presencia de abundante flujo génico. Lo que parece claro es que un flujo génico abundante puede inhibir la diferenciación genética impidiendo que la selección natural y la

deriva establezcan y amplifiquen diferencias locales y que esta inhibición será más efectiva cuando mayores sean los niveles de flujo génico (*op cit*).

Dado el conjunto de resultados obtenidos en este estudio, los grupos evaluados de *G. angustifolia* en el eje cafetero Colombiano podrían ser considerados una sola población que intercambia una buena proporción de información genética y la presencia de moderada estructuración poblacional puede ser explicada por algún proceso de selección que favorezca la prevalencia de un exceso de heterocigotos, sin embargo, estudios de diversidad genética y estructura poblacional que involucren representantes de poblaciones naturales de otras zonas geográficas del país deben ser realizados para concluir de manera más precisa sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones naturales de *G. angustifolia*.

## 7. CONCLUSIONES

- El conjunto de los nueve marcadores microsatélites utilizados en el estudio brindó gran cantidad de información que resultó de gran importancia para el análisis de diversidad genética y estructura poblacional de *G. angustifolia*. Solo los marcadores FJ444935 y FJ476075 resultaron poco polimórficos e informativos para materiales del Eje Cafetero Colombiano, sin embargo, deben ser evaluados con materiales procedentes de otras regiones del país.
- Se encontró una diversidad genética alta para los materiales evaluados del Eje Cafetero Colombiano, lo que indica que a pesar del uso indebido, la tala indiscriminada y el agotamiento rápido del recurso, aun se conserva variación genética importante para el mantenimiento de la especie.
- Los resultados de los análisis de estructuración poblacional mostraron que existe una moderada diferenciación genética, sin embargo, el alto flujo genético entre los grupos permite proponer que posiblemente hasta el momento no hay una marcada diferenciación de las poblaciones que permita la evolución independiente de las mismas y que con el tiempo origine nuevas variantes en la especie.
- Las pruebas de correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas, el análisis discriminante y los valores de distancia genética encontrados entre grupos no fueron evidencia suficiente para proponer que existe estructuración poblacional asociada a ubicaciones geográficas. Dado el conjunto de resultados obtenidos en este estudio y la relativa zona geográfica pequeña de evaluación para la especie, los grupos evaluados de *G. angustifolia* en el eje cafetero Colombiano podrían ser considerados una sola población que intercambia una buena proporción de información genética y la presencia de moderada estructuración poblacional a pesar del flujo genético existente puede ser explicada por algún proceso de selección que favorezca la prevalencia de un exceso de heterocigotos.
- Los resultados de esta investigación podrán ser utilizados para establecer estrategias de uso y manejo sostenible del recurso, además, para ser usados en futuros programas de conservación, selección y mejoramiento genético de la especie.

## 8. RECOMENDACIONES

- A pesar de que el uso de los nueve marcadores moleculares microsatélites fue adecuado para el estudio de diversidad genética y estructura poblacional, se recomienda realizar estudios que conduzcan a la generación y desarrollo de nuevos microsatélites para *G. angustifolia*, con el fin de ser utilizados en futuros estudios en el Eje Cafetero y otras zonas geográficas del país.
- Dado que el presente estudio evaluó características de los materiales del Eje Cafetero ocurridas en el pasado reciente, pero reflejadas en la actualidad; es altamente recomendable la realización del mismo estudio de diversidad genética en aproximadamente diez años (dos generaciones), para realizar comparaciones y monitorear el estado de las poblaciones a través del tiempo. Además, otros estudios de diversidad genética y estructura poblacional que involucren representantes de poblaciones naturales de otras zonas geográficas del país deben ser realizados para concluir de manera más precisa sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones naturales de *G. angustifolia*.
- Deben realizarse estudios moleculares más detallados, posiblemente usando los microsatélites de este estudio, donde se comparen plantas provenientes de semilla sexual con sus respectivas plantas madre, además de un estudio de biología reproductiva, acompañado de estudios citogenéticos en la especie con el fin de explicar de manera más clara el exceso de heterocigotos presentes en la población y el posible caso de autoincompatibilidad reportado en este estudio y por otros investigadores.
- Proponer el establecimiento de un banco de germoplasma *in situ* (conservación) en el eje cafetero Colombiano, dado que todos los grupos mostraron una alta diversidad genética y presencia de materiales (clones) con características superiores deseables (Muñoz 2011).

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUDELO, B., TORO, I. Y. 1994. Evaluación del desarrollo de los bosques de *Guadua angustifolia* en la zona de jurisdicción de la CVC bajo diferentes condiciones de sitio, con fines de reforestación. Tesis. Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Forestal, Ibagué. pp. 168.
- BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M., DAVIS, R. W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* 32:182–190.
- BYSTRIAKOVA, N., KAPOS, V., STAPLETON, C., LYSENKO, I. 2003. Bamboo Biodiversity. UNEP-WCMC/INBAR.
- CAMARGO, J. C. 2006. Growth and productivity of the bamboo species *Guadua angustifolia* Kunth in the coffee region of Colombia. Tesis Doctorado. Universidad de Göttingen. Alemania. pp. 205.
- CAMPOS, H., SEGUEL, I. 2000. Biotecnología y recursos genéticos vegetales. *Agro Sur* 28 (1) 13-24.
- CASTAÑO, F., MORENO, R. D. 2004. *Guadua para todos. Cultivo y aprovechamiento*. Bogotá. pp. 190.
- CAUJAPE, J. 2006. Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. EXEGEN Ediciones. Las Palmas de Gran Canaria. España. pp. 132.
- EWENS, W. 1972. The sampling theory of selectively neutral alleles. *Theor. Pop. Biol.* 3: 87- 112.
- FERREIRA, M. E., GRATTAPAGLIA, D. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia. EMBRAPA-CENARGEN. p.p 220.
- FRIAR, E., KOCHERT, G. 1994. A study of genetic variation and evolution of *Phyllostochis* (Bambusoideae : Poaceae) using nuclear Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics.* (89): 265 - 270.
- GIRALDO, E., SABOGAL, A. 1999. *La Guadua: una alternativa sostenible*. Corporación Autónoma Regional del Quindío-CRQ. pp 75.

GÓMEZ, G.D., S.M., CRUZ, C.A. AGUDELO, E. GIRALDO. 2001. Caracterización Morfológica y Anatómica de Cuatro Biotipos de *Guadua angustifolia* Kunth. En: Monografías de la Flora Andina, Vol 3. Universidad del Quindío: 119-159.

GRAHAM, J., McNICOL, R. J. 1995. An examination of the ability of RAPD markers to determine the relationships within and between *Rubus* species. *Theor Appl genet* 90 (7-8): 1128 – 1132.

HEDRICK, P. W. 2002. Lethals in finite populations. *Evolution* 56: 654-657.

HELD, C., MANZANO, I. V. 2004. El sector productivo y el mercado regional de la guadua en el Eje Cafetero Colombiano. INBAR Working Paper 51. pp. 61.

HENG, H. P., YEHO H. H., TAN C.K.C., RAO A.N. 1996. Leaf isozyme polymorphisms in Bamboo species. *Journal of the Singapore National Academy of Science*. (22): 10-14.

HIDALGO, O. 2003. Bamboo. The gift of the gods. Bogotá. Editado por Oscar Hidalgo López. pp. 553.

JOSEPH, H., ANDERSON, R., TATHAM, R., BLACK, W. 1992. Multivariate data Analysis with Readings. 3<sup>rd</sup> Ed. Riverside. pp. 554.

JUDZIEWICZ, E., CLARK, L., LONDOÑO, X., STERN, M. 1999. *American Bamboos. Smithsonian*. 392p. Institution Press, Washington.

KELCHNER, S. A., CLARK, L. G. 1997 Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl 16 intron in *Chusquea* and *Bambusiodeae* (Poaceae). *Molecular phylogenetics and Evolution*. (8): 385 –397.

KIMURA, M., CROW, J. F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

KIMURA, M. 1968. Evolutionary rate at the molecular level. *Nature* 217:624-626.

KIRST, M., CORDEIRO, M., REZENDE, D., GRATTAPAGLIA, D. 2005. Power of Microsatellite Markers for Fingerprinting and Parentage Analysis in *Eucalyptus grandis* Breeding Populations. *Journal of Heredity* 96(2):161–166.

KOBAYASHI, M. 1997. Phylogeny of word bamboos analysed by restriction fragment length polymorphisms of chloroplast DNA. In: Chapman G.P. ed. The bamboos. Linnean Society Symposium Series. UK.: Linnean Society of London: 61-81.

LONDOÑO, X. 1989. Una nueva variedad de *Guadua angustifolia* Kunth de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 17(65): 379-381.

LONDOÑO, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). Caldasia 16 (77):139-153.

LONDOÑO, X. 2006. Estudio de caso: Cadena productiva nacional de la guadua *Guadua angustifolia* Kunth Poaceae: Bambusoideae. Tomo I 398-400 p. En Chaves, M.E. y Santamaría M. (eds.) 2006. Informe sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998-2004. Instituto de Investigaciones de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, DC. Colombia. 2 Tomos.

LONDOÑO, X., CLARK, L. G. 2002. Three new taxa of *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from South America. Novon 12: 64-76.

LONDOÑO, X. 2004. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. En: Memorias III Congreso Colombiano de Botánica, Popayán Colombia.

MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. Cancer Research 27: 209–220.

MARULANDA, M. L., MÁRQUEZ, P., LONDOÑO, X. 2002. AFLP's analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with emphasis in the Coffee Region. *J. Amer. Bamboo Sc.*16 (1): 32-42.

MARULANDA, M., LOPEZ, A. M., CLAROS, J. L. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. in Colombia using rice and sugarcane microsatellites. *Crop breeding and Applied Biotechnology* 7:43-51.

MEJÍA, N. 2004. Acuerdo de Competitividad para la Cadena Productiva de la Guadua. Documento Soporte. Armenia, Colombia.

MUÑOZ, J. E., LONDOÑO, X. 2011. Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero. Sexto informe Proyecto No. MADR2008M6336-3616. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

MUÑOZ, J. E. 2011. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. pp. 151.

MUÑOZ, J. E., NÚÑEZ, E., MORALES, L., LONDOÑO, X. 2011. Selección de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth. Resúmenes VI Congreso Colombiano de Botánica. Cali, 11-15 Agosto de 2011. ISBN: 978-958-99009-1-8. p.p. 136.

NEI, M. 1973. Analysis of genetic diversity in subdivided populations. *Proc Nat Acad Sci USA* 70: 3321-3326.

PAINTING, K.A., PERRY, M.C., DENNING, R.A., AYAD, W. G. 1993. Guía para la documentación de recursos Genéticos. Consejo Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma. pp. 309.

PÉREZ, A. M. 2006. *Guadua angustifolia* Kunth, 1822. Ficha para la conservación de recursos biológicos Instituto Alexander von Humboldt. Colombia. Acceso electrónico:

<http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=280&method=displayAAT>

PÉREZ-GALINDO, P., CARLOS-ANDRÉS, C., GONZÁLEZ, G., IVÁN-ANDRÉS I., CÁRDENAS, H. 2009. Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Ecology Resources* 9(5) 1375-1379.

POTOSÍ C. T., VALLEJO F. A., PALACIO, J. D. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en *Guadua* en el departamento del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica Palmira* 55 (2).

RAO, A. N., RAO, V. R. 2000. Bamboo Conservation, Diversity, Ecogeography, Germplasm, Resource Utilization and Taxonomy. Proceeding of training course, 10-17 May 1998, Kuming and Xishuangbanna, Yunnan, China. Pp. 275.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. 1995. GenePop (version 1.2) population genetic software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86: 248-249.

RIAÑO, N. M., LONDOÑO, X., LOPEZ, Y., GÓMEZ, J. H. 2002. Plant growth and biomass distribution on *Guadua angustifolia* Kunth in relation to ageing in the Valle del Cauca – Colombia. *Bamboo, Science & Culture. J. Amer. Bamboo Sc.* 16 (1): 43-51.

RÍOS, C. I. 1993 El nacedero *Trichanthera gigantea* H & B, Un árbol con potencial para la construcción de sistema sostenibles de producción. Convenio IMCA-CIPAV.

ROHLF, F. J. 1998. NTSYS-pc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis version 2.02j. Applied Biostatistics Inc.

ROMERO, M., CABRERA, E., ORTIZ, N. 2008. Informe sobre el estado de la Biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 186 p. Acceso electrónico: [http://www.humboldt.org.co/download/Informe\\_Nacional\\_biodiversidad\\_I.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/Informe_Nacional_biodiversidad_I.pdf)

ROSALES, M., PRESTON, T., VARGAS, J. 1992. Advances in the characterization of non conventional resources with potential use in animal production. Animal Production in Developing Countries. Occasional publication No. 16. P. 228-229.

RUGELES, P. A. 2011. Genotipificación mediante marcadores moleculares RAMs (Microsatélites amplificados al azar) y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth. Tesis de grado para optar al título de Magister en Ciencias con énfasis en recursos fitogenéticos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. pp.136

SAMBROOK J., FRITSCH E. F, MANIATIS T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

SÁNCHEZ, L. A., DEL REAL, A., RODRÍGUEZ – GARCÍA, M. E. 2010. Caracterización morfológica de culmos de *Guadua angustifolia* Kunth por medio de microscopia electrónica de barrido. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, México.

SLATKIN, M. 1994. An exact test for neutrality based on the Ewens sampling distribution. Genetical Research 64: 71-74.

SOKAL, R. R. 1979. Testing statistical significance of geographical variation patterns. Systematic Zoology 8: 227-232.

STEWART, J. 1999. Variación genética en árboles forrajeros. En: Congreso Latinoamericano de agroforestería para la producción animal sostenible. CIPAV Cali. ISBN 958-9386-22-9.

TORRES, L. 2008. Evaluación del polimorfismo de marcadores microsatélites en *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) para la caracterización molecular de las accesiones del banco de germoplasma de bambusoideae del jardín botánico Juan María Céspedes de Tuluá- Valle del Cauca. Tesis para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle. Cali. pp. 63.

TORRES, L., LÓPEZ, D. C., PALACIO, J. D., DUQUE, M. C., PÉREZ-GALINDO, C. A., GONZÁLEZ-VARGAS, A., CÁRDENAS-HENAO, H. 2009. Evaluation of the

Polymorphic of Microsatellites Markers in *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). VIII World Bamboo Congress Proceedings.

VALLEJO, F. A., ESTRADA, E. I. 2002. Mejoramiento genético de plantas. Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira. pp. 402.

WATANABE, M., ITO, M., KURITA, S. 1994. Chloroplast DNA phylogeny of Asian Bamboos and its systematic implication. *Journal of Plant Research (Japan)*. 107(1087): 253 –261.

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38: 1358-1358.

WHITLOCK, M.C., MCCAULEY, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}=1/(4Nm + 1)$ . *Heredity* 82: 117-117.

WRIGHT, S. 1931. Evolution in Mendelian populations. *Genetics* 16: 97-159.

WRIGHT, S. 1951. The genetical structure of populations. *Annals of Eugenetics* 15: 323-323.

WRIGHT, S. 1978. Evolution and the genetics of populations, variability within and among natural populations, Vol 4. University of Chicago Press. Chicago.

ZANE, L., BARGELLONI, L., PATARNELLO, T. 2002. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* (11) 1-16

## ANEXOS

Anexo A. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas con nueve marcadores moleculares microsatélites en 72 muestras de *Guadua angustifolia*.

Muestra	Grupo	Marcadores Usados																	
		31	29	75	30	35	34	32	36	76									
A1	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	2	3
A2	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	2	3
A3	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	3	4
D1	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
D3	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	3	4
D5	2	2	3	2	3	1	1	1	1	1	1	2	3	1	2	1	2	3	4
E2	2	1	1	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	1	3
E4	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	1	3
E5	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	3	3	4
H1	1	1	4	2	3	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	3
H2	1	1	4	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
H3	1	1	4	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
J1	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	1	1	1	2	3
J2	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	2	2	3
J3	2	2	4	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	1	1	2	2	3
K1	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	2	3
K2	2	2	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	2	2	1	2	2	2
K3	2	2	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	2	2	1	3	2	4
L1	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	1	1	3	2	3
L2	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	2	3
L3	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	2	3
M1	2	1	3	2	3	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	3	1	4
M2	2	1	3	2	3	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	3	3	4
M3	2	1	3	2	3	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	1	3	3	4
N1	1	1	4	1	2	1	1	1	3	1	1	2	2	1	3	1	3	3	4
N2	1	1	4	2	2	1	1	1	3	1	1	2	2	1	3	2	2	3	4
N3	1	1	4	2	2	1	1	1	3	1	1	2	2	1	3	2	3	3	4
O1	1	1	3	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	3	1	3	3	4
O2	1	1	3	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	3	1	3	3	4

<b>O3</b>	<b>1</b>	1	3	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
<b>P1</b>	<b>2</b>	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	3	1	2	3	4
<b>P2</b>	<b>2</b>	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	3	1	2	3	4
<b>P3</b>	<b>2</b>	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4
<b>Q1</b>	<b>3</b>	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	3	4
<b>Q2</b>	<b>3</b>	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	3	4
<b>Q3</b>	<b>3</b>	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
<b>R1</b>	<b>3</b>	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
<b>R2</b>	<b>3</b>	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
<b>R3</b>	<b>3</b>	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	4
<b>S11</b>	<b>3</b>	2	3	1	2	1	2	1	3	1	2	2	3	1	2	2	2	3	4
<b>S10</b>	<b>3</b>	2	4	1	2	1	2	1	3	1	1	3	3	1	2	2	3	3	4
<b>S12</b>	<b>3</b>	2	3	1	2	1	1	1	3	1	1	3	3	1	2	3	3	3	4
<b>T1</b>	<b>3</b>	1	1	1	2	1	2	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
<b>T2</b>	<b>3</b>	1	3	2	2	1	1	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
<b>T3</b>	<b>3</b>	1	3	1	2	1	1	1	3	1	2	2	3	1	2	1	3	3	4
<b>U1</b>	<b>4</b>	1	3	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	4
<b>U2</b>	<b>4</b>	1	3	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	4
<b>U3</b>	<b>4</b>	1	3	2	3	1	1	1	1	2	2	1	2	1	3	1	3	3	4
<b>V1</b>	<b>4</b>	1	3	2	3	1	2	1	1	1	2	1	3	1	3	1	3	2	4
<b>V2</b>	<b>4</b>	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
<b>V3</b>	<b>4</b>	1	3	2	2	1	2	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
<b>W1</b>	<b>4</b>	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
<b>W2</b>	<b>4</b>	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	2	3	4
<b>W3</b>	<b>4</b>	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	2	3	4
<b>X1</b>	<b>4</b>	1	2	3	3	1	1	1	2	2	2	1	3	1	2	1	2	1	4
<b>X2</b>	<b>4</b>	1	2	3	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	3	1	4
<b>X3</b>	<b>4</b>	1	2	3	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	3	1	4
<b>Y1</b>	<b>4</b>	1	2	2	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3
<b>Y2</b>	<b>4</b>	1	2	3	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	3	1	3
<b>Y3</b>	<b>4</b>	1	2	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	3
<b>Z1</b>	<b>4</b>	1	1	2	3	2	2	1	2	1	2	1	3	1	2	1	2	3	4
<b>Z2</b>	<b>4</b>	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
<b>Z3</b>	<b>4</b>	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	3	1	2	1	3	3	4
<b>α1</b>	<b>3</b>	1	3	2	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1	1	1	3	3	4
<b>α2</b>	<b>3</b>	1	3	2	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1	1	1	3	3	4
<b>α3</b>	<b>3</b>	1	3	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	3	3	4
<b>σ1</b>	<b>2</b>	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
<b>σ2</b>	<b>2</b>	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	3	2	4
<b>σ3</b>	<b>2</b>	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	2	2	2	4

<b>PE1</b>	<b>5</b>	1	3	3	4	1	1	2	3	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3
<b>PE2</b>	<b>5</b>	1	3	3	4	1	1	2	3	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3
<b>PE3</b>	<b>5</b>	1	3	3	4	1	1	2	2	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3

Anexo B. Base de datos con información de colecta de 90 materiales pertenecientes al banco de ADN. Cada sitio está representado por 3 materiales colectados.

SITIO	FINCA ó HACIENDA	LAT N	LONG O	A.S.N.M (m)	DEPTO	MUNICIPIO	VEREDA
A	La Esmeralda	4,518	-75,790		Quindío	Pueblo Tapao	
B	Finca La Elena	4,531	-75,816	1220	Quindío	Montenegro	
C	Hacienda Nápoles	4,555	-75,802	1250	Quindío	Montenegro	
D	Hacienda Nápoles	4,564	-75,810	1247	Quindío	Montenegro	
E	Hacienda Nápoles	4,557	-75,808	1223	Quindío	Montenegro	
F	Hacienda Nápoles	4,555	-75,803	1244	Quindío	Montenegro	
G	Hacienda Nápoles	4,551	-75,802	1239	Quindío	Montenegro	
H	Finca la Secreta	4,597	-75,660	1616	Quindío	Circasia	HOJAS ANCHAS
I	Finca El Porvenir	4,569	-75,667	1522	Quindío	Circasia	
J	Finca El Ocaso potrero La Laguna	4,599	-75,816	1164	Quindío	Quimbaya	EL LAUREL
K	Finca El Ocaso potrero El Guácimo	4,596	-75,814	1164	Quindío	Quimbaya	EL LAUREL
L	Finca Balsora	4,519	-75,771	1190	Quindío	Armenia	LA REVANCHA
M	Finca La Mejorana	4,607	-75,755	1420	Quindío	Quimbaya	TROCADEROS
N	Finca El Ocaso	4,593	-75,811		Quindío	Quimbaya	EL LAUREL
N1	Finca Belén	4,597	-75,646	1683	Quindío	Circasia	
O	Finca Yarima	4,784	-75,788	1221	Risaralda	Pereira	LOS PLANES
P	Finca Eupen	4,836	-75,825	1140	Risaralda	Pereira	
Q	Finca Eupen	4,840	-75,821	1135	Risaralda	Pereira	
R	Finca Filipina	4,736	-75,754	1298	Risaralda	Pereira	LA SELVA
S	Finca la Esmeralda	4,738	-75,774	1212	Risaralda	Pereira	EL AGUACATE
T	CEBG	4,402	-75,716	1176	Quindío	Cordoba	
U	Finca la Piragua	4,968	-75,715	1153	Risaralda	Marsella	KIOSKO
V	Finca la Española	4,952	-75,701	1020	Risaralda	Marsella	KIOSKO
W	Finca el Naranjal	4,968	-75,661	1318	Caldas	Chinchina	LA FLORESTA ALTOS DEL NARANJAL
X	Finca La Esperanza	5,000	-75,565	1776	Caldas	Chinchina	
Y	Finca Lomas	5,005	-75,587	1308	Caldas	Manizales	LAS PAVAS
Z	Finca El Nogal	5,008	-75,657	1318	Caldas	Palestina	EL HIGUERON
Alfa	Villa Martha	4,865	-75,752	1320	Risaralda	Marsella	
Beta	Finca Las Brisas	4,674	-75,838	1201	Valle	Cartago	COLORADO
Gama	Finca Corozal	4,678	-75,842		Valle	Cartago	COLORADO

Anexo C. Salida de la prueba para desequilibrio de ligamiento (Slatkin 1994) usando el programa Arlequin versión 3.11

```
=====  
== Pairwise linkage disequilibrium : (4)  
=====
```

Reference: *Slatkin, M. 1994a.*  
*Slatkin, M. and Excoffier, L. 1996.*  
*Lewontin, R. C., and K. Kojima 1960.*

Test of linkage disequilibrium for all pairs of loci:  
-----

Permutation test using the EM algorithm

Number of permutations : 10000

Number of initial conditions for EM : 10

Pair(0, 1)

LnLHood LD : -53.99967 LnLHood LE : -55.90083

Exact P= 0.64307 +- 0.00518 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 3.80232 (P = 0.43342, 4 d.f.)

Pair(0, 2)

LnLHood LD : -42.43033 LnLHood LE : -42.99584

Exact P= 0.64574 +- 0.00458 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 1.13102 (P = 0.56807, 2 d.f.)

Pair(1, 2)

LnLHood LD : -41.68551 LnLHood LE : -44.35528

Exact P= 0.11337 +- 0.00328 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 5.33954 (P = 0.06927, 2 d.f.)

Pair(0, 3)

LnLHood LD : -38.55976 LnLHood LE : -40.79494

Exact P= 0.16990 +- 0.00456 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 4.47037 (P = 0.10697, 2 d.f.)

Pair(1, 3)

LnLHood LD : -41.66778 LnLHood LE : -42.15438

Exact P= 0.72535 +- 0.00406 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 0.97320 (P = 0.61471, 2 d.f.)

Pair(2, 3)

LnLHood LD : -28.56753 LnLHood LE : -29.24939

Exact P= 0.38396 +- 0.00457 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 1.36372 (P = 0.24289, 1 d.f.)

Pair(0, 4)

LnLHood LD : -42.54760 LnLHood LE : -44.57660

Exact P= 0.16713 +- 0.00428 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 4.05800 (P = 0.13147, 2 d.f.)

Pair(1, 4)

LnLHood LD : -44.81116 LnLHood LE : -45.93604

Exact P= 0.41129 +- 0.00461 (10100 permutations done)

Chi-square test value= 2.24977 (P = 0.0032469, 2 d.f.)

Pair(2, 4)

LnLHood LD : -32.42763                      LnLHood LE : -33.03105  
 Exact P= 0.37911 +- 0.00468 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 1.20684 (P = 0.27196, 1 d.f.)  
 Pair(3, 4)

LnLHood LD : -30.70080                      LnLHood LE : -30.83015  
 Exact P= 0.75733 +- 0.00416 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 0.25871 (P = 0.61101, 1 d.f.)  
 Pair(0, 5)

LnLHood LD : -42.57725                      LnLHood LE : -48.82841  
 Exact P= 0.01713 +- 0.00130 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value=12.50232 (P = 0.1398, 4 d.f.)  
 Pair(1, 5)

LnLHood LD : -45.78967                      LnLHood LE : -50.18785  
 Exact P= 0.10317 +- 0.00247 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 8.79635 (P = 0.06640, 4 d.f.)  
 Pair(2, 5)

LnLHood LD : -32.48017                      LnLHood LE : -37.28286  
 Exact P= 0.00851 +- 0.00088 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 9.60536 (P = 0.0821, 2 d.f.)  
 Pair(3, 5)

LnLHood LD : -33.23523                      LnLHood LE : -35.08196  
 Exact P= 0.15168 +- 0.00362 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 3.69347 (P = 0.15775, 2 d.f.)  
 Pair(4, 5)

LnLHood LD : -36.36401                      LnLHood LE : -38.86362  
 Exact P= 0.11455 +- 0.00266 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 4.99923 (P = 0.08212, 2 d.f.)  
 Pair(0, 6)

LnLHood LD : -46.52948                      LnLHood LE : -51.77581  
 Exact P= 0.06257 +- 0.00230 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value=10.49266 (P = 0.3290, 4 d.f.)  
 Pair(1, 6)

LnLHood LD : -48.19063                      LnLHood LE : -53.13526  
 Exact P= 0.07970 +- 0.00284 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 9.88926 (P = 0.4234, 4 d.f.)  
 Pair(2, 6)

LnLHood LD : -39.16894                      LnLHood LE : -40.23027  
 Exact P= 0.48703 +- 0.00503 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 2.12266 (P = 0.34600, 2 d.f.)  
 Pair(3, 6)

LnLHood LD : -36.86458                      LnLHood LE : -38.02937  
 Exact P= 0.49465 +- 0.00487 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 2.32957 (P = 0.31199, 2 d.f.)  
 Pair(4, 6)

LnLHood LD : -41.18887                      LnLHood LE : -41.81103  
 Exact P= 0.72149 +- 0.00474 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value= 1.24432 (P = 0.53678, 2 d.f.)  
 Pair(5, 6)

LnLHood LD : -38.77412                      LnLHood LE : -46.06284  
 Exact P= 0.00535 +- 0.00075 (10100 permutations done)  
 Chi-square test value=14.57742 (P = 0.0566, 4 d.f.)  
 Pair(0, 7)

LnLHood LD : -46.42234                      LnLHood LE : -50.68346

Exact P= 0.12198 +- 0.00317 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 8.52225 (P = 0.07422, 4 d.f.)  
Pair(1, 7)  
LnLHood LD : -48.07206 LnLHood LE : -52.04291  
Exact P= 0.17842 +- 0.00355 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 7.94169 (P = 0.09374, 4 d.f.)  
Pair(2, 7)  
LnLHood LD : -37.31615 LnLHood LE : -39.13791  
Exact P= 0.28178 +- 0.00431 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 3.64352 (P = 0.16174, 2 d.f.)  
Pair(3, 7)  
LnLHood LD : -33.55295 LnLHood LE : -36.93702  
Exact P= 0.03059 +- 0.00166 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 6.76813 (P = 0.3391, 2 d.f.)  
Pair(4, 7)  
LnLHood LD : -40.65284 LnLHood LE : -40.71868  
Exact P= 0.98911 +- 0.00103 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 0.13167 (P = 0.93628, 2 d.f.)  
Pair(5, 7)  
LnLHood LD : -36.34345 LnLHood LE : -44.97048  
Exact P= 0.00030 +- 0.00017 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=17.25408 (P = 0.173, 4 d.f.)  
Pair(6, 7)  
LnLHood LD : -38.15265 LnLHood LE : -47.91789  
Exact P= 0.00030 +- 0.00017 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=19.53048 (P = 0.062, 4 d.f.)  
Pair(0, 8)  
LnLHood LD : -50.46833 LnLHood LE : -55.48261  
Exact P= 0.16871 +- 0.00376 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=10.02857 (P = 0.12345, 6 d.f.)  
Pair(1, 8)  
LnLHood LD : -46.60773 LnLHood LE : -56.84206  
Exact P= 0.00158 +- 0.00039 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=20.46865 (P = 0.228, 6 d.f.)  
Pair(2, 8)  
LnLHood LD : -41.03395 LnLHood LE : -43.93706  
Exact P= 0.16832 +- 0.00369 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 5.80623 (P = 0.12143, 3 d.f.)  
Pair(3, 8)  
LnLHood LD : -38.57577 LnLHood LE : -41.73617  
Exact P= 0.11386 +- 0.00270 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 6.32079 (P = 0.09700, 3 d.f.)  
Pair(4, 8)  
LnLHood LD : -44.91941 LnLHood LE : -45.51783  
Exact P= 0.92069 +- 0.00268 (10100 permutations done)  
Chi-square test value= 1.19684 (P = 0.75376, 3 d.f.)  
Pair(5, 8)  
LnLHood LD : -41.12469 LnLHood LE : -49.76963  
Exact P= 0.00327 +- 0.00051 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=17.28989 (P = 0.0827, 6 d.f.)  
Pair(6, 8)  
LnLHood LD : -41.93152 LnLHood LE : -52.71704  
Exact P= 0.00079 +- 0.00030 (10100 permutations done)  
Chi-square test value=21.57105 (P = 0.145, 6 d.f.)

Pair(7, 8)

LnLHood LD : -41.57872

LnLHood LE : -51.62469

Exact P= 0.00089 +- 0.00028 (10100 permutations done)

Chi-square test value=20.09194 (P = 0.267, 6 d.f.)

Histogram of the number of linked loci per locus

Locus:	0	1	2	3	4	5	6	7	8
	0	0	1	0	1	0	0	0	0

Table of significant linkage disequilibrium (significance level=0.0500):

Locus #	0	1	2	3	4	5	6	7	8
0	*	-	-	-	-	-	-	-	-
1	-	*	-	-	-	-	-	-	-
2	-	-	*	-	+	-	-	-	-
3	-	-	-	*	-	-	-	-	-
4	-	-	+	-	*	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	*	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-	*	-	-
7	-	-	-	-	-	-	-	*	-
8	-	-	-	-	-	-	-	-	*

Anexo D. Matriz de distancias geográficas (metros) para los 23 sitios evaluados provenientes del Eje Cafetero Colombiano calculada usando los datos de geo-referencia y mediante el programa Diva-Gis 7.3.0.1 ([www.diva-gis.org](http://www.diva-gis.org)).

	A M X	B N Y	C N1 Z	D O Alfa	E P Beta	F Q Gama	G R	H S	I T	J U	K V	L W
A	0.0											
B	3173.6	0.0										
C	4329.7	3017.1	0.0									
D	5608.6	3731.0	1349.6	0.0								
E	4819.4	3049.0	676.0	792.8	0.0							
F	4416.5	3043.4	98.3	1252.1	583.6	0.0						
G	3934.7	2712.8	400.6	1707.2	960.6	482.4	0.0					
H	17013.4	18828.4	16543.2	17104.7	17049.8	16591.7	16603.1	0.0				
I	14856.0	17051.9	15133.6	15912.9	15713.9	15197.1	15119.2	3278.6	0.0			
J	9467.2	7533.0	5137.6	3915.4	4702.3	5051.6	5533.9	17390.6	16926.4	0.0		
K	9081.0	7227.0	4754.0	3564.9	4344.4	4670.1	5152.3	17082.9	16565.4	436.6	0.0	
L	2091.3	5074.4	5250.7	6600.0	5875.3	5348.5	4914.8	15194.3	12894.8	10177.9	9758.2	0.0
M	10713.0 9998.2	10835.4 0.0	7873.9	7786.2	8093.5	7871.6	8132.1	10613.8	10654.5	6895.0	6641.2	
N	8699.5 9340.1	6934.9 6407.0	4380.3 0.0	3235.4	4002.1	4299.1	4780.2	16780.9	16208.2	873.2	436.6	
N1	18306.5 16437.7	20220.3 12133.8	17994.3 18301.8	18584.5 0.0	18512.1	18045.0	18043.2	1523.3	3896.5	18913.5	18605.0	
O	29615.0 29536.5	28292.8 20002.4	25543.1 21362.0	24569.2 26095.4	25298.1 0.0	25479.6	25934.5	25164.7	27446.9	20831.1	21093.7	
P	35659.0 35807.4	33985.8 26647.3	31433.8 27100.5	30334.4 33188.0	31101.5 7098.5	31360.4 0.0	31833.2	32263.2	34522.2	26454.4	26775.8	

Q	36105.7 36227.9	34465.0 27005.8	31892.9 27569.2	30804.3 33351.3	31568.6 7302.8	31820.5 626.0	32291.9 0.0	32448.9	34749.5	26932.2	27249.1	
R	24651.7 24265.2	23831.7 14366.5	20897.6 17113.8	20134.1 19610.1	20782.7 6489.7	20850.1 13587.8	21265.2 13776.5	18676.0 0.0	21003.8	16782.7	16943.4	
S	24582.4 24380.4	23490.2 14709.5	20638.5 16626.6	19761.5 21153.1	20454.7 5341.2	20582.2 12301.0	21020.6 12569.6	20126.0 2180.7	22252.8 0.0	16196.0	16406.9	
T	15288.2 14389.2	18121.9 23220.9	19505.2 23724.7	20836.7 23040.6	20062.7 43223.3	19599.4 49796.7	19131.0 50178.1	22618.3 37425.9	19342.1 37922.3	24554.3 0.0	24139.1	
U	50804.5 50369.7	49890.3 40396.2	47001.9 43042.6	46166.3 41987.5	46847.4 22043.0	46950.0 19025.9	47376.8 18400.1	41689.2 26152.9	44736.3 26416.0	42601.4 62971.9	42820.3 0.0	
V	49382.1 48873.7	48583.4 38880.1	45662.5 41788.2	44871.7 40020.1	45535.2 21100.7	45614.0 18815.3	46031.4 18195.4	39768.1 24766.8	42851.7 25191.0	41382.5 61260.9	41583.5 2319.6	0.0
W	52190.1 51525.7 4779.3	51623.7 41544.3 0.0	48653.7 44957.1	47951.6 41388.5	48578.9 24925.0	48612.1 23336.0	49009.1 22724.4	41306.3 27843.4	44491.3 28548.0	44616.3 63335.5	44784.9 5967.6	
X	59303.9 58328.5 16094.4	59227.2 48613.4 11322.9	56210.8 52945.0 0.0	55702.1 45810.3	56244.4 34617.3	56184.0 34157.2	56531.9 33565.6	46088.9 36182.6	49367.3 37339.9	52739.7 68689.4	52840.7 17106.5	
Y	58827.0 57930.6 14034.3	58618.3 48115.8 9263.4	55607.2 52214.1 2515.1	55044.3 45945.2 0.0	55611.3 33317.1	55576.3 32435.7	55938.4 31833.7	46141.6 35287.7	49413.2 36324.0	51970.3 68679.4	52090.5 14868.1	
Z	56551.2 55909.8 7908.9	55936.8 45922.3 4417.8	52976.8 49232.3 10294.3	52252.8 45760.1 7813.5	52889.6 28899.7 0.0	52933.6 26667.0	53335.4 26043.9	45697.5 32124.4	48890.1 32743.8	48871.9 67752.9	49050.5 7849.5	
Alfa	38925.6 38620.5 11224.5	37867.1 28740.1 15298.4	35019.3 30982.0 25712.5	34136.9 32113.8 24126.7	34834.7 9912.7 19087.7	34963.4 8631.3 0.0	35400.7 8090.8	31540.9 14374.0	34336.3 14381.5	30514.5 51713.6	30746.0 12141.8	
Beta	18217.6 18800.0 34438.8	16145.9 11859.1 38139.3	13889.1 9525.0 47289.8	12656.3 22953.6 46203.0	13447.5 13348.7 42199.0	13804.0 18070.2 23261.0	14286.3 18591.9 0.0	21531.0 11526.3	22305.5 10001.7	8753.3 33181.5	9136.9 35382.3	
Gama	18735.8 19349.6 34288.4	16615.1 12469.4 38038.2	14406.1 10053.7 47283.4	13160.1 23532.4 46167.1	13952.3 13187.8 42071.4	14319.8 17716.5 23091.6	14802.0 18247.6 610.6	22114.4 11674.1 0.0	22908.7 10065.0	9268.6 33735.2	9659.2 35196.0	

## Anexo E. Salida del análisis discriminante mediante el programa SAS versión 9.0 y realizado con los datos obtenidos de nueve marcadores microsatélites en 72 materiales de *G. angustifolia*

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 1

### Procedimiento DISCRIM

Observaciones	72	Total DF	71
Variables	18	Clases Within DF	67
Clases	5	Clases Between DF	4

### Información del nivel de la clase

Grupo	Nombre de variable	Frecuencia	Peso	Probabilidad Proporción	anterior
1	_1	9	9.0000	0.125000	0.125000
2	_2	27	27.0000	0.375000	0.375000
3	_3	15	15.0000	0.208333	0.208333
4	_4	18	18.0000	0.250000	0.250000
5	_5	3	3.0000	0.041667	0.041667

### Información de la matriz de covarianza ponderada

Rango de la matriz de covarianza	Registro natural de la Determinante de la matriz de covarianza
18	-39.32384

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 2

### Procedimiento DISCRIM

#### Pairwise Generalized Squared Distances Between Groups

$$D^2(i|j) = (\bar{X}_i - \bar{X}_j)' \text{COV}^{-1} (\bar{X}_i - \bar{X}_j) - 2 \ln \text{PRIOR}_j$$

#### Distancia cuadrada generalizada para Grupo

De Grupo	1	2	3	4	5
1	4.15888	23.00958	16.73271	59.80533	60.84766
2	25.20681	1.96166	19.14800	26.48413	82.64002
3	17.75436	17.97242	3.13723	41.21948	86.47235
4	61.19162	25.67320	41.58412	2.77259	133.49442
5	58.65043	78.24557	83.25348	129.91090	6.35611

#### Función discriminante lineal

$$\text{Constant} = -\sum_j \bar{X}_j' \text{COV}^{-1} \bar{X}_j + \ln \text{PRIOR}_j \quad \text{Coefficient} = \text{COV}^{-1} \bar{X}_j$$

#### Función discriminante lineal para Grupo

Variable	1	2	3	4	5
Constant	-184.13074	-179.44685	-170.23888	-186.68839	-219.51972
e					
m31	7.14899	19.81553	9.76879	26.84751	2.57551
m31b	8.13853	3.76721	4.90098	-0.10896	6.57736
m29	9.09779	9.01089	7.07305	13.36448	11.85514
m29b	5.79579	4.16545	1.00574	-4.77983	9.63525
m75	76.94398	83.67896	75.42533	96.11572	71.89154
m75b	3.21365	4.51293	4.89608	4.28442	1.49885
m30	0.26863	0.04780	5.05503	3.36529	18.11895
m30b	7.02660	-3.88918	2.89757	-12.58319	7.02217
m35	29.74442	32.55427	32.84624	35.20832	26.01635
m35b	1.21655	3.80195	4.48124	12.58859	0.90826
m34	9.56779	12.32439	8.67381	8.56571	12.91703
m34b	0.58495	-0.04775	1.13804	-1.84953	4.31718
m32	51.94132	56.29182	50.50402	48.09336	59.00425

m32b	7.44017	7.82610	3.78443	13.72843	13.81775
m36	-0.49420	-5.27839	0.70273	-7.29898	8.33016
m36b	5.45078	5.72895	5.17263	7.85616	3.17913
m76	2.48318	-3.23539	-0.62645	-7.16437	4.74833
m76b	13.03769	18.85040	19.32117	24.33153	-1.22824

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 3

Procedimiento DISCRIM  
 Resultados de clasificación para los datos calibrados: WORK.MICRO  
 Resultados de resustitución usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D(X) = \sum_j \frac{1}{j} (\bar{X} - X_j)' \text{COV}^{-1} \sum_j \frac{1}{j} (\bar{X} - X_j) - 2 \ln \text{PRIOR}$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\Pr(j|X) = \frac{\exp(-.5 D(X))}{\sum_k \exp(-.5 D(X))}$$

Probabilidad posterior de pertenencia a Grupo

Obs	Clasificado		1	2	3	4	5
	De Grupo	en Grupo					
1	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
2	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
3	2	2	0.0000	0.9997	0.0003	0.0000	0.0000
4	2	2	0.0000	0.9984	0.0002	0.0014	0.0000
5	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
6	2	2	0.0000	0.8330	0.0000	0.1670	0.0000
7	2	2	0.0000	0.9992	0.0000	0.0007	0.0000
8	2	2	0.0011	0.9985	0.0004	0.0000	0.0000
9	2	2	0.1106	0.8716	0.0178	0.0000	0.0000
10	1	1	0.9996	0.0000	0.0004	0.0000	0.0000
11	1	1	0.7980	0.1547	0.0472	0.0000	0.0000
12	1	1	0.7980	0.1547	0.0472	0.0000	0.0000
13	2	2	0.0000	0.9997	0.0003	0.0000	0.0000
14	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
15	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
16	2	2	0.0002	0.9946	0.0045	0.0006	0.0000
17	2	2	0.0003	0.9997	0.0000	0.0000	0.0000
18	2	2	0.0000	0.9997	0.0000	0.0003	0.0000
19	2	2	0.0000	0.9340	0.0655	0.0005	0.0000
20	2	2	0.0000	0.9999	0.0000	0.0001	0.0000
21	2	2	0.0000	0.8318	0.0010	0.1672	0.0000
22	2	2	0.0000	0.9391	0.0605	0.0004	0.0000
23	2	2	0.0325	0.9393	0.0282	0.0000	0.0000
24	2	2	0.0325	0.9393	0.0282	0.0000	0.0000
25	1	1	0.9976	0.0000	0.0024	0.0000	0.0000
26	1	1	0.9986	0.0000	0.0014	0.0000	0.0000
27	1	1	0.9990	0.0000	0.0010	0.0000	0.0000
28	1	1	0.9998	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000
29	1	1	0.9998	0.0001	0.0001	0.0000	0.0000
30	1	1	0.9954	0.0001	0.0045	0.0000	0.0000
31	2	2	0.0007	0.9979	0.0010	0.0004	0.0000

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 4

Procedimiento DISCRIM  
 Resultados de clasificación para los datos calibrados: WORK.MICRO  
 Resultados de resustitución usando Función discriminante lineal

Probabilidad posterior de pertenencia a Grupo

Obs	Clasificado		1	2	3	4	5
	De Grupo	en Grupo					
32	2	2	0.0007	0.9979	0.0010	0.0004	0.0000
33	2	2	0.0001	0.9991	0.0008	0.0000	0.0000
34	3	3	0.0075	0.0005	0.9920	0.0000	0.0000
35	3	3	0.0075	0.0005	0.9920	0.0000	0.0000
36	3	3	0.0055	0.3185	0.6760	0.0000	0.0000
37	3	3	0.0057	0.0003	0.9940	0.0000	0.0000
38	3	3	0.0057	0.0003	0.9940	0.0000	0.0000
39	3	3	0.0000	0.0002	0.9995	0.0003	0.0000
40	3	3	0.0000	0.0012	0.9988	0.0000	0.0000
41	3	3	0.0557	0.0456	0.8987	0.0000	0.0000
42	3	3	0.0039	0.0006	0.9955	0.0000	0.0000
43	3	3	0.0001	0.0007	0.9993	0.0000	0.0000
44	3	1*	0.6480	0.0003	0.3518	0.0000	0.0000
45	3	3	0.0092	0.0001	0.9907	0.0000	0.0000

46	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
47	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
48	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
49	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
50	4	4	0.0000	0.0009	0.0000	0.9991	0.0000
51	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
52	4	4	0.0000	0.0001	0.0000	0.9999	0.0000
53	4	4	0.0000	0.0005	0.0000	0.9995	0.0000
54	4	4	0.0000	0.0005	0.0000	0.9995	0.0000
55	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
56	4	4	0.0000	0.0003	0.0000	0.9997	0.0000
57	4	4	0.0000	0.0003	0.0000	0.9997	0.0000
58	4	4	0.0000	0.0010	0.0000	0.9990	0.0000
59	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
60	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
61	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
62	4	4	0.0000	0.0007	0.0001	0.9992	0.0000
63	4	4	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000
64	3	3	0.0000	0.0001	0.9999	0.0000	0.0000
65	3	3	0.0000	0.0001	0.9999	0.0000	0.0000
66	3	3	0.0000	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000
67	2	2	0.0001	0.9998	0.0001	0.0000	0.0000
68	2	2	0.0000	1.0000	0.0000	0.0000	0.0000
69	2	2	0.0001	0.9957	0.0042	0.0000	0.0000
70	5	5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
71	5	5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000
72	5	5	0.0000	0.0000	0.0000	0.0000	1.0000

\* Observación mal clasificada

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 5

Procedimiento DISCRIM  
Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.MICRO  
Resumen de resustitución usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j^2(X) = \sum_j (\bar{X} - X_j)' \text{COV}_j^{-1} (X - X_j) - 2 \ln \text{PRIOR}_j$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\Pr(j|X) = \frac{\exp(-.5 D_j^2(X))}{\sum_k \exp(-.5 D_k^2(X))}$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	3	4	5	Total
1	9	0	0	0	0	9
	100.00	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00
2	0	27	0	0	0	27
	0.00	100.00	0.00	0.00	0.00	100.00
3	1	0	14	0	0	15
	6.67	0.00	93.33	0.00	0.00	100.00
4	0	0	0	18	0	18
	0.00	0.00	0.00	100.00	0.00	100.00
5	0	0	0	0	3	3
	0.00	0.00	0.00	0.00	100.00	100.00
Total	10	27	14	18	3	72
	13.89	37.50	19.44	25.00	4.17	100.00
Anteriores	0.125	0.375	0.20833	0.25	0.04167	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	3	4	5	Total
Tasa	0.0000	0.0000	0.0667	0.0000	0.0000	0.0139
Anteriores	0.1250	0.3750	0.2083	0.2500	0.0417	

Sistema SAS 08:29 Thursday, April 29, 2011 6

Procedimiento DISCRIM  
Resumen de clasificación para los datos calibrados: WORK.MICRO  
Resumen de validación cruzada usando Función discriminante lineal

Función de la distancia cuadrada generalizada

$$D_j(X) = \frac{1}{\sigma_j} \left( \frac{X - \bar{X}_j}{\sigma_j} \right) \text{COV}^{-1} \left( \frac{X - \bar{X}_j}{\sigma_j} \right) - 2 \ln \text{PRIOR}$$

Probabilidad posterior de miembro en cada Grupo

$$\text{Pr}(j|X) = \frac{\exp(-.5 D_j(X))}{\sum_k \exp(-.5 D_k(X))}$$

Número de observaciones y porcentaje clasificado en Grupo

De Grupo	1	2	3	4	5	Total
1	7 77.78	2 22.22	0 0.00	0 0.00	0 0.00	9 100.00
2	0 0.00	21 77.78	2 7.41	3 11.11	1 3.70	27 100.00
3	3 20.00	1 6.67	10 66.67	1 6.67	0 0.00	15 100.00
4	0 0.00	0 0.00	0 0.00	18 100.00	0 0.00	18 100.00
5	0 0.00	0 0.00	0 0.00	0 0.00	3 100.00	3 100.00
Total	10 13.89	24 33.33	12 16.67	22 30.56	4 5.56	72 100.00
Anteriores	0.125	0.375	0.20833	0.25	0.04167	

Estimaciones de cuenta de error para Grupo

	1	2	3	4	5	Total
Tasa	0.2222	0.2222	0.3333	0.0000	0.0000	0.1806
Anteriores	0.1250	0.3750	0.2083	0.2500	0.0417	

# Anexo F. Prueba Exacta de diferenciación poblacional (Raymond and Rousset 1995) para 72 materiales de *G. angustifolia*, provenientes de 23 sitios del Eje Cafetero Colombiano y un sitio en Perú, distribuidos en 5 grupos formados y realizada mediante el programa TFGA.

29/04/2011 8:42:42  
 Analysis of C:\TFPGA2~1\W24.TXT  
 Data set contains genotypes of individuals sampled from populations.  
 Organism Type: Diploid  
 Marker Type: Codominant

Exact tests for population differentiation  
 (Raymond and Rousset 1995)  
 # of dememorization steps: 1000  
 # of batches: 10  
 # of permutations per batch: 2000

Results over loci  
 X-sq : 56,0979  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Results over loci  
 X-sq : 35,2680  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0087

Pairwise analysis of all populations  
 Groups compared: 1 vs. 2

Groups compared: 1 vs. 3

Groups compared: 1 vs. 4

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 9 0 3 6 18  
 2 10 21 14 9 54  
 Total 19 21 17 15 72  
 locus 1 : p = 0,0008 S.E. :0,0003

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 9 0 3 6 18  
 3 14 4 7 5 30  
 Total 23 4 10 11 48  
 locus 1 : p = 0,2959 S.E. :0,0114

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 9 0 3 6 18  
 4 18 13 5 0 36  
 Total 27 13 8 6 54  
 locus 1 : p = 0,0014 S.E. :0,0014

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 1 11 6 0 18  
 2 8 28 15 3 54  
 Total 9 39 21 3 72  
 locus 2 : p = 0,6301 S.E. :0,0128

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 3 11 18 1 30  
 Total 12 29 7 48  
 locus 2 : p = 0,0033 S.E. :0,0015

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 4 6 16 14 36  
 Total 7 27 20 54  
 locus 2 : p = 0,4599 S.E. :0,0134

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 15 3 18  
 2 40 14 54  
 Total 55 17 72  
 locus 3 : p = 0,5386 S.E. :0,0043

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 15 3 18  
 3 21 9 30  
 Total 36 12 48  
 locus 3 : p = 0,4948 S.E. :0,0044

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 15 3 18  
 4 26 10 36  
 Total 41 13 54  
 locus 3 : p = 0,5006 S.E. :0,0052

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 3 6 18  
 2 25 29 0 54  
 Total 34 32 6 72  
 locus 4 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 3 6 18  
 3 12 12 6 30  
 Total 21 15 12 48  
 locus 4 : p = 0,2215 S.E. :0,0088

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 3 6 18  
 4 28 8 0 36  
 Total 37 11 6 54  
 locus 4 : p = 0,0009 S.E. :0,0005

Locus 5  
 Group Alleles: 1 Total  
 1 18 18  
 2 54 54  
 Total 72 72  
 locus 5 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 18 0 18  
 3 28 2 30  
 Total 46 2 48  
 locus 5 : p = 0,5228 S.E. :0,0027

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 18 0 18  
 4 25 11 36  
 Total 43 11 54  
 locus 5 : p = 0,0122 S.E. :0,0019

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 2 6 20 28 54  
 Total 7 31 34 72  
 locus 6 : p = 0,2285 S.E. :0,0096

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 3 7 8 15 30  
 Total 8 19 21 48  
 locus 6 : p = 0,0617 S.E. :0,0047

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 4 23 3 10 36  
 Total 24 14 16 54  
 locus 6 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 4 5 18  
 2 31 21 2 54  
 Total 40 25 7 72  
 locus 7 : p = 0,0142 S.E. :0,0023

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 4 5 18  
 3 18 12 0 30  
 Total 27 16 5 48  
 locus 7 : p = 0,0083 S.E. :0,0016

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 4 5 18  
 4 18 11 7 36  
 Total 27 15 12 54  
 locus 7 : p = 0,6472 S.E. :0,0086

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 7 4 7 18  
 2 26 17 11 54  
 Total 33 21 18 72  
 locus 8 : p = 0,3417 S.E. :0,0125

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 7 4 7 18  
 3 11 8 11 30  
 Total 18 12 18 48  
 locus 8 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 7 4 7 18  
 4 19 5 12 36  
 Total 26 9 19 54  
 locus 8 : p = 0,5408 S.E. :0,0052

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 0 0 10 8 18  
 2 3 14 22 15 54  
 Total 3 14 32 23 72  
 locus 9 : p = 0,0438 S.E. :0,0039

Locus 9  
 Group Alleles: 3 4 Total  
 1 10 8 18  
 3 15 15 30  
 Total 25 23 48  
 locus 9 : p = 0,7719 S.E. :0,0030

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 0 0 10 8 18  
 4 6 1 14 15 36  
 Total 6 1 24 23 54  
 locus 9 : p = 0,2309 S.E. :0,0081

Results over loci  
 X-sq : 63,8723  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 1 vs. 5

Locus 1  
 Group Alleles: 1 3 4 Total  
 1 9 3 6 18  
 5 3 3 0 6  
 Total 12 6 6 24  
 locus 1 : p = 0,1615 S.E. :0,0041

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 1 1 11 6 0 18  
 5 0 0 3 3 6  
 Total 1 11 9 3 24  
 locus 2 : p = 0,0017 S.E. :0,0006

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 1 15 3 18  
 5 6 0 6  
 Total 21 3 24  
 locus 3 : p = 0,5471 S.E. :0,0048

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 3 6 18  
 5 0 4 2 6  
 Total 9 7 8 24  
 locus 4 : p = 0,0246 S.E. :0,0022

Locus 5  
 Group Alleles: 1 Total  
 1 18 18  
 5 6 6  
 Total 24 24  
 locus 5 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 1 11 6 18  
 5 0 0 6 6  
 Total 1 11 12 24  
 locus 6 : p = 0,0213 S.E. :0,0018

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 9 4 5 18  
 5 3 0 3 6  
 Total 12 4 8 24  
 locus 7 : p = 0,4905 S.E. :0,0093

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 1 7 4 7 18  
 5 0 6 0 6  
 Total 7 10 7 24  
 locus 8 : p = 0,0066 S.E. :0,0008

Locus 9  
 Group Alleles: 2 3 4 Total  
 1 0 10 8 18  
 5 3 3 0 6  
 Total 3 13 8 24  
 locus 9 : p = 0,0062 S.E. :0,0022

Results over loci  
 X-sq : 54,3571  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 2 vs. 3

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 10 21 14 9 54  
 3 14 4 7 5 30  
 Total 24 25 21 14 84  
 locus 1 : p = 0,0219 S.E. :0,0051

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total

2 8 28 15 3 54  
 3 11 18 1 0 30  
 Total 19 46 16 3 84  
 locus 2 : p = 0,0030 S.E. :0,0009

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 40 14 54  
 3 21 9 30  
 Total 61 23 84  
 locus 3 : p = 0,7997 S.E. :0,0038

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 25 29 0 54  
 3 12 12 6 30  
 Total 37 41 6 84  
 locus 4 : p = 0,0024 S.E. :0,0004

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 54 0 54  
 3 28 2 30  
 Total 82 2 84  
 locus 5 : p = 0,1180 S.E. :0,0027

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 6 20 28 54  
 3 7 8 15 30  
 Total 13 28 43 84  
 locus 6 : p = 0,3112 S.E. :0,0134

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 31 21 2 54  
 3 18 12 0 30  
 Total 49 33 2 84  
 locus 7 : p = 0,8226 S.E. :0,0062

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 26 17 11 54  
 3 11 8 11 30  
 Total 37 25 22 84  
 locus 8 : p = 0,2696 S.E. :0,0140

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 3 14 22 15 54  
 3 0 0 15 15 30  
 Total 3 14 37 30 84  
 locus 9 : p = 0,0020 S.E. :0,0008

Results over loci  
 X-sq : 53,8652  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 2 vs. 4

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 10 21 14 9 54  
 4 18 13 5 0 36  
 Total 28 34 19 9 90  
 locus 1 : p = 0,0022 S.E. :0,0013

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 8 28 15 3 54  
 4 6 16 14 0 36  
 Total 14 44 29 3 90  
 locus 2 : p = 0,4515 S.E. :0,0117

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 40 14 54  
 4 26 10 36  
 Total 66 24 90  
 locus 3 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 25 29 54  
 4 28 8 36  
 Total 53 37 90  
 locus 4 : p = 0,0046 S.E. :0,0009

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 54 0 54  
 4 25 11 36  
 Total 79 11 90  
 locus 5 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 6 20 28 54  
 4 23 3 10 36  
 Total 29 23 38 90  
 locus 6 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 31 21 2 54  
 4 18 11 7 36  
 Total 49 32 9 90  
 locus 7 : p = 0,0573 S.E. :0,0030

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 26 17 11 54  
 4 19 5 12 36  
 Total 45 22 23 90  
 locus 8 : p = 0,1201 S.E. :0,0121

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 3 14 22 15 54  
 4 6 1 14 15 36  
 Total 9 15 36 30 90  
 locus 9 : p = 0,0064 S.E. :0,0012

Results over loci  
 X-sq : 84,3525  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 2 vs. 5

Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 10 21 14 9 54  
 5 3 0 3 0 6  
 Total 13 21 17 9 60  
 locus 1 : p = 0,0524 S.E. :0,0031

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 8 28 15 3 54  
 5 0 0 3 3 6  
 Total 8 28 18 6 60  
 locus 2 : p = 0,0017 S.E. :0,0010

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 2 40 14 54  
 5 6 0 6  
 Total 46 14 60  
 locus 3 : p = 0,3174 S.E. :0,0041

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 25 29 0 54  
 5 0 4 2 6  
 Total 25 33 2 60  
 locus 4 : p = 0,0007 S.E. :0,0003

Locus 5  
 Group Alleles: 1 Total  
 2 54 54  
 5 6 6  
 Total 60 60  
 locus 5 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 6 20 28 54  
 5 0 0 6 6  
 Total 6 20 34 60  
 locus 6 : p = 0,1019 S.E. :0,0056

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 31 21 2 54

5 3 0 3 6  
 Total 34 21 5 60  
 locus 7 : p = 0,0040 S.E. :0,0015

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 2 26 17 11 54  
 5 0 6 0 6  
 Total 26 23 11 60  
 locus 8 : p = 0,0051 S.E. :0,0013

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 2 3 14 22 15 54  
 5 0 3 3 0 6  
 Total 3 17 25 15 60  
 locus 9 : p = 0,3885 S.E. :0,0056

Results over loci  
 X-sq : 63,5824  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 3 vs. 4  
 Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 3 14 4 7 5 30  
 4 18 13 5 0 36  
 Total 32 17 12 5 66  
 locus 1 : p = 0,0171 S.E. :0,0026

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 11 18 1 30  
 4 6 16 14 36  
 Total 17 34 15 66  
 locus 2 : p = 0,0023 S.E. :0,0013

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 3 21 9 30  
 4 26 10 36  
 Total 47 19 66  
 locus 3 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 12 12 6 30  
 4 28 8 0 36  
 Total 40 20 6 66  
 locus 4 : p = 0,0024 S.E. :0,0011

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 3 28 2 30  
 4 25 11 36  
 Total 53 13 66  
 locus 5 : p = 0,0289 S.E. :0,0030

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 7 8 15 30  
 4 23 3 10 36  
 Total 30 11 25 66  
 locus 6 : p = 0,0040 S.E. :0,0012

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 18 12 0 30  
 4 18 11 7 36  
 Total 36 23 7 66  
 locus 7 : p = 0,0369 S.E. :0,0026

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 11 8 11 30  
 4 19 5 12 36  
 Total 30 13 23 66  
 locus 8 : p = 0,2964 S.E. :0,0111

Locus 9

Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 3 0 0 15 15 30  
 4 6 1 14 15 36  
 Total 6 1 29 30 66  
 locus 9 : p = 0,0767 S.E. :0,0091

Results over loci  
 X-sq : 64,6980  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 3 vs. 5  
 Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 3 14 4 7 5 30  
 5 3 0 3 0 6  
 Total 17 4 10 5 36  
 locus 1 : p = 0,5883 S.E. :0,0066

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 3 11 18 1 0 30  
 5 0 0 3 3 6  
 Total 11 18 4 3 36  
 locus 2 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 3 21 9 30  
 5 6 0 6  
 Total 27 9 36  
 locus 3 : p = 0,3043 S.E. :0,0053

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 12 12 6 30  
 5 0 4 2 6  
 Total 12 16 8 36  
 locus 4 : p = 0,1039 S.E. :0,0060

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 3 28 2 30  
 5 6 0 6  
 Total 34 2 36  
 locus 5 : p = 1,0000 S.E. :0,0000

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 7 8 15 30  
 5 0 0 6 6  
 Total 7 8 21 36  
 locus 6 : p = 0,0962 S.E. :0,0058

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 18 12 0 30  
 5 3 0 3 6  
 Total 21 12 3 36  
 locus 7 : p = 0,0009 S.E. :0,0003

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 3 11 8 11 30  
 5 0 6 0 6  
 Total 11 14 11 36  
 locus 8 : p = 0,0015 S.E. :0,0005

Locus 9  
 Group Alleles: 2 3 4 Total  
 3 0 15 15 30  
 5 3 3 0 6  
 Total 3 18 15 36  
 locus 9 : p = 0,0009 S.E. :0,0005

Results over loci  
 X-sq : 73,6311  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Groups compared: 4 vs. 5  
 Locus 1  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 4 18 13 5 36  
 5 3 0 3 6  
 Total 21 13 8 42  
 locus 1 : p = 0,0468 S.E. :0,0036

Locus 2  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 4 6 16 14 0 36  
 5 0 0 3 3 6  
 Total 6 16 17 3 42  
 locus 2 : p = 0,0004 S.E. :0,0002

Locus 3  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 4 26 10 36  
 5 6 0 6  
 Total 32 10 42  
 locus 3 : p = 0,3062 S.E. :0,0057

Locus 4  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 4 28 8 0 36  
 5 0 4 2 6  
 Total 28 12 2 42  
 locus 4 : p = 0,0001 S.E. :0,0001

Locus 5  
 Group Alleles: 1 2 Total  
 4 25 11 36  
 5 6 0 6  
 Total 31 11 42  
 locus 5 : p = 0,1819 S.E. :0,0046

Locus 6  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 4 23 3 10 36  
 5 0 0 6 6  
 Total 23 3 16 42  
 locus 6 : p = 0,0040 S.E. :0,0013

Locus 7  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 4 18 11 7 36  
 5 3 0 3 6  
 Total 21 11 10 42  
 locus 7 : p = 0,1513 S.E. :0,0054

Locus 8  
 Group Alleles: 1 2 3 Total  
 4 19 5 12 36  
 5 0 6 0 6  
 Total 19 11 12 42  
 locus 8 : p = 0,0000 S.E. :0,0000

Locus 9  
 Group Alleles: 1 2 3 4 Total  
 4 6 1 14 15 36  
 5 0 3 3 0 6  
 Total 6 4 17 15 42  
 locus 9 : p = 0,0039 S.E. :0,0011

Results over loci  
 X-sq : 91,9560  
 df : 18  
 Overall: p = 0,0000

Matrix of combined probabilities for each pairwise comparison

	1	2	3	4	5
1	*****				
2	0,0000	*****			
3	0,0087	0,0000	*****		
4	0,0000	0,0000	0,0000	*****	
5	0,0000	0,0000	0,0000	0,0000	*****
*****					