



PERÚ

Ministerio de Agricultura

Dirección General Forestal y de
Fauna Silvestre

ESTUDIO GENETICO UTILIZANDO MARCADORES MICROSATELITES DE TRES EJEMPLARES DE *Guadua angustifolia* RECOLECTADOS EN PERU

Proyecto PD428/06 Rev.2(F)

“Promoción de la Rehabilitación, Manejo y Uso Sostenible de los Bosques
Tropicales de Bambú en la Región Noroccidental del Perú”

INFORME FINAL

A.M. Posso¹, J.E. Muñoz² & X. Londoño³

^{1,2} Universidad Nacional de Colombia, sede Palmira

³ Sociedad Colombiana del Bambú

2012, PERU

ESTUDIO GENETICO UTILIZANDO MARCADORES MICROSATELITES DE TRES EJEMPLARES DE *Guadua angustifolia* RECOLECTADAS EN PERU

A.M. Posso¹, J.E.Muñoz² & X. Londoño³

INTRODUCCIÓN

En el marco del proyecto PD428/06 Rev.2(F) "Promoción de la Rehabilitación, Manejo y Uso Sostenible de los Bosques Tropicales de Bambú en la Región Noroccidental del Perú" y del proyecto "Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia" se propone estudiar la diversidad genética de tres (3) ejemplares de *Guadua angustifolia* recolectados en el Departamento de San Martín, Perú en mayo de 2010 por X. Londoño & J. Takahashi correspondientes a los números de herbario 1037(PE1), 1054(PE2) y 1043(PE3).

Los marcadores microsatélites son una herramientas genéticas popular dado su alto polimorfismo y su relativa fácil estandarización. Además, su capacidad para diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos los convierte en marcadores de gran interés para estudios de diversidad genética (Zane et. Al., 2002), razón por la cual se escogen para este estudio.

METODOLOGIA

1. Material vegetal. La colecta de materiales vegetales para la extracción de ADN realizada en el proyecto "Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero" se realizo en 30 sitios del Eje Cafetero, involucrando los departamentos del Quindío, Risaralda, Caldas y Valle del Cauca.

Se incluyó como grupo externo las muestras de *Guadua angustifolia* procedentes del Perú. Para la extracción del ADN se tomaron hojas tiernas, aun sin abrir, ubicadas al final del complemento foliar, y se conservaron en nitrógeno líquido (Colombia) y en sílica gel (Perú).

Se realizo una base de datos computarizada utilizando el programa Diva-Gis versión 7.3.0.1 (www.diva-geis.org) en donde se registro la mayor cantidad de información disponible y se asigno un código único para cada material.

2. Caracterización Molecular. 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 0.045 M; EDTA 0,001M) y teñidos con bromuro de etilo a una concentración final de 0.5 µg/ml. Las concentraciones se determinaron por comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago Lambda.

3. Marcadores moleculares microsatélites. La caracterización molecular se realizo en el laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

Colombia sede Palmira. Se evaluaron los únicos 9 marcadores microsatélites disponibles y descritos previamente para *Guadua angustifolia* (Tabla 1) 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 1. 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: CCTATACACTATATGCATTGTGTGG	(CTAT) 10	450-500	54	4
FJ476075	R: GTTCCTACATGTAGACATATCC F: CTCTTGGGAGTGAGCATGGTGAC	(CTAT) 13	175-195	48	5
FJ444934	R: CCCGACAGATAGATGGTCAAA F: CTCATTTCTCAATTGCGCAAGAG	(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

4. 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.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

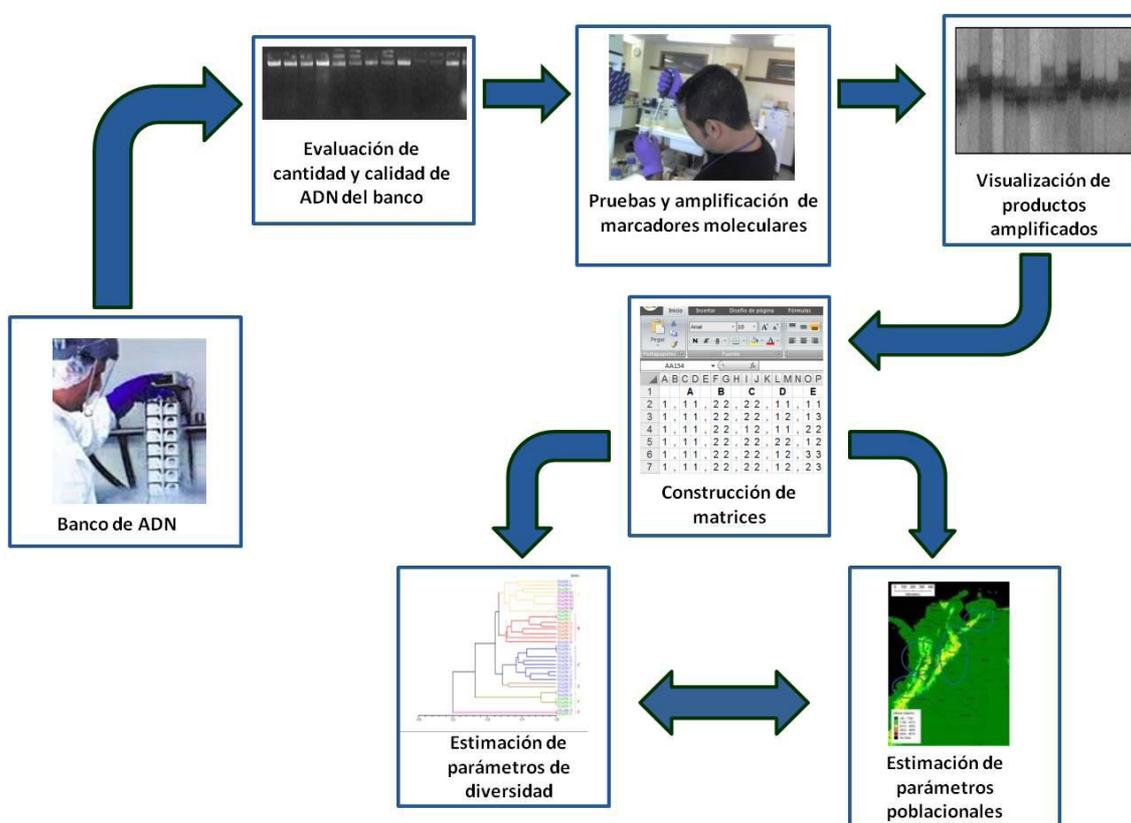
³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

La similitud genética se calculo mediante el coeficiente de Nei-Li (1979). El dendrograma que indica la agrupación de los materiales se realizo con el programa NTSYS-pc utilizando el método UPGMA, método grafico por agrupamiento por parejas que usa el promedio aritmético no ponderado.

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 formula no sesgada de Nei (1973).

La metodología resumida y de manera secuencial se presenta en la figura 1.

Figura 1. Diagrama resumido de la metodología utilizada en el proyecto.



RESULTADOS Y DISCUSION

La cuantificación de 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, 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.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

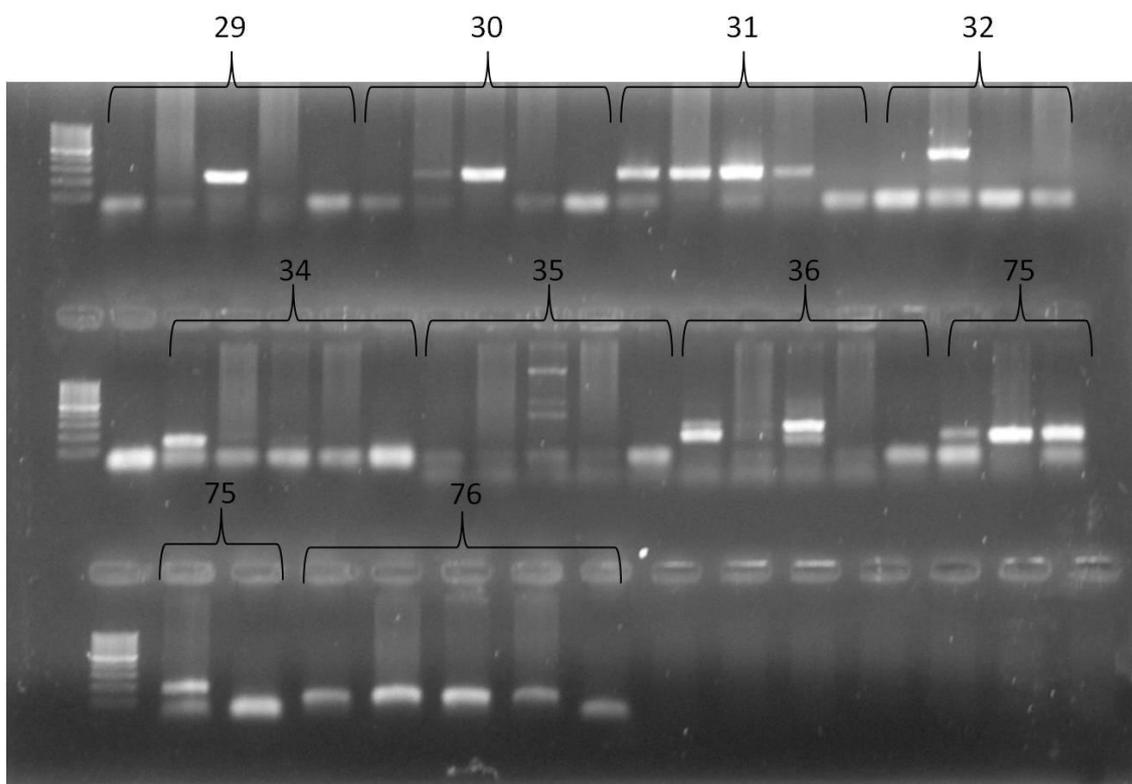
³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

La gran 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, de allí que la utilidad del banco de ADN se limita a genes de herencia simple entre los cuales se destacan genes de resistencia a enfermedades, genes reguladores de enzimas involucradas en metabolismo secundario y proteínas de importancia nutricional (Campos & Seguel, 2000).

1. Amplificación por PCR de marcadores moleculares microsatelites

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 debido quizás a la calidad del ADN utilizado (Figura 2).

Figura 2. Productos amplificados por PCR de nueve marcadores microsatélites utilizados.



Los cambios realizados correspondieron a la adición de albumina de suero bovino (BSA) para mejorar la calidad de productos amplificados ya que el BSA actúa como adyuvante, incrementando la eficiencia de la PCR y actúa como proteína captadora de iones que pueden ser inhibidores de la *Taq* polimerasa.

Además de la adición de albumina se aumentó 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 2. Los fragmentos obtenidos se encontraron de acuerdo a los rangos establecidos previamente por Pérez-Galindo *et al.* (2009), entre 70 – 500 pb.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

Tabla 2. Rangos de tamaño y temperatura de hibridación para los nueve marcadores microsatélites utilizados.

Marcador	Motivo repetido	Tamaño (pb)	Temperatura de hibridación (C°)
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

2. Visualización de productos amplificados.

El tiempo de corrida debió ser adaptado dependiendo del tamaño de cada microsatélite y presentó una variación entre 50 y 80 minutos. La técnica permitió una diferenciación clara de individuos homocigotos de heterocigotos y tuvo el suficiente poder de resolución para revelar los diferentes patrones de bandas (alelos) presentes en las muestras evaluadas.

3. Características de los marcadores utilizados.

El número de alelos encontrados en las muestras estudiadas variaron entre 2 y 5 alelos. En este estudio todos los marcadores utilizados tuvieron valores de ENA (Numero efectivo de Alelos) cercanos al número de alelos, a excepción del marcador FJ444935, el cual no resulto muy informativo (Tabla 3). Según este criterio, los mejores marcadores fueron FJ444931 y FJ444934, sin embargo los restantes marcadores mostraron buenos valores de ENA y por lo tanto son recomendables para estudios de diversidad genética de la especie.

Tabla 3. Número de alelos, frecuencia alélica mínima (Pa), probabilidad de alelos nulos (r), y número efectivo de alelos (ENA) estimado para los nueve marcadores microsatelites usados.

Marcador	No. Alelos	(r)	No. Efectivo de alelos (ENA)
FJ444930	3	- 0.108	2.377
FJ444929	4	- 1.118	2.776
FJ444932	3	- 0.171	2.370
FJ476075	2	- 0.069	1.607

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

FJ444934	3	- 0.010	2.855
FJ444931	5	- 0.086	4.651
FJ444936	3	- 0.125	2.898
FJ444935	2	- 0.035	1.198
FJ476076	4	- 0.194	2.874

4. Análisis descriptivo.

El análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-LI (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA (Figura 3) mostro que a un nivel aproximado de similitud de 0.52, se logro diferenciar entre los materiales procedentes del Perú y los materiales del Eje Cafetero.

Estudios genéticos de Muñoz & Londoño (2011) y Muñoz (2011) reportan variación dentro de un gradual, al tomar muestras de 24 individuos en la periferia de un mismo rodal. A mayor distancia recorrida dentro del gradual mayor es la distancia genética entre los materiales, lo que se explica por el fenómeno frecuente de floración y formación de semillas sexuales que sufre la especie *Guadua angustifolia*. La variación encontrada entre estos 24 sitios es debida posiblemente a que no hay auto fecundación por la morfología de la flor, siendo el viento y los insectos los encargados de este proceso, el cual se favorece por la cercanía geográfica entre los individuos o sitios.

5. Análisis de correspondencia múltiple (ACM).

Este análisis muestra la formación de un grupo aparte con los materiales procedentes del Perú, mientras que los materiales del Eje Cafetero presentan alta diversidad genética pero no forman agrupamientos en la zona de estudio.

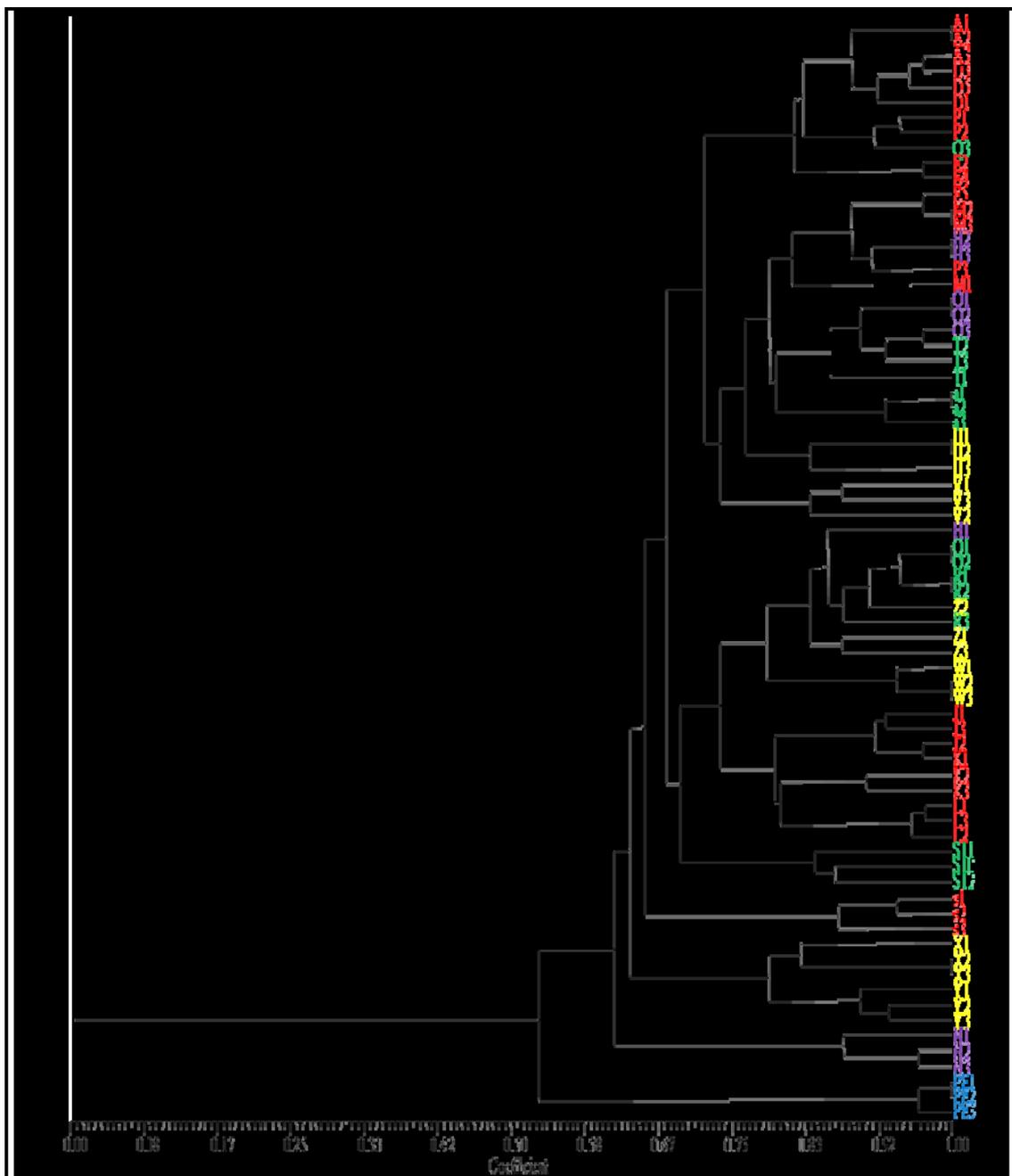
La presencia de una alta diversidad genética en los recursos silvestres y poblaciones naturales es de gran importancia ya que constituyen un reservorio de "variación" genética (alelos) que permiten la supervivencia de la especie y contiene información necesaria para afrontar cambios ambientales bióticos y abióticos, además, es el componente fundamental para la utilización de los recursos genéticos a través de programas de selección y mejoramiento genético.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

Figura 3. 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*.



¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

6. Índices de diversidad genética: heterocigosidad y porcentaje de loci polimórficos.

La H_e (heterocigosidad esperada) estima la probabilidad que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de una población sean diferentes, mientras que la H_o (heterocigosidad observada) hace referencia a la proporción de individuos heterocigotos presentes y observados en una muestra poblacional. Los valores de H_e , de H_o y porcentaje de loci polimórficos (P) obtenidos en el presente estudio se presenta en la Tabla 4.

Los valores de H_e para todos los grupos fue muy similar y estuvo alrededor de 0.5 (Tabla 4) a excepción del grupo con los materiales procedentes del Perú, lo que se explica posiblemente por el bajo número de muestras evaluadas para ese grupo, sin embargo se recomienda la realización de estudios adicionales con materiales provenientes de esta zona para confirmar lo propuesto.

El porcentaje de Loci polimórficos (P) obtenidos en este estudio estuvo entre 88.88 y 100% para los grupos del Eje Cafetero y 55.5% para los materiales del Perú (Tabla 4).

Tabla 4. 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 9 marcadores microsatelites.

Grupo	H_e	H_o	P (%)
1	0.505	0.728	88.88
2	0.526	0.728	88.88
3	0.533	0.726	100
4	0.544	0.697	100
PERÚ	0.326	0.518	55.5

7. Consanguinidad (F)

La consanguinidad es la probabilidad de que los 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.

Los valores de F obtenidos para cada uno de los grupos estuvo entre 0.22 y 0.37 (Tabla 5). 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

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

por la reproducción vegetativa, el tipo de reproducción predominante de la especie *Guadua angustifolia*.

Tabla 5. Valores de consanguinidad (F) obtenidos por cada uno de los marcadores y su promedio.

Marcador	F
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
Promedio	0.158

El valor más alto obtenido para los materiales provenientes de Perú (0.37) puede ser explicado por el bajo número de individuos evaluados.

Distancia genética

A pesar que los valores de distancia genética calculados con el índice de Nei (1973) no fueron muy altos comparados con otros estudios de diversidad genética en *G. angustifolia* (Potosi et al. 2006; Torres 2008), en este estudio la mayor distancia genética se dio entre el grupo 5 y los demás grupos del Eje Cafetero, resultado que puede explicarse por la distancia geográfica alta entre estas poblaciones (Tabla 6).

Tabla 6. Distancias genéticas obtenidas mediante el índice de Nei (1978) para los cinco grupos evaluados de *G. angustifolia*, en donde el grupo 5 corresponde a Perú.

	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	*****

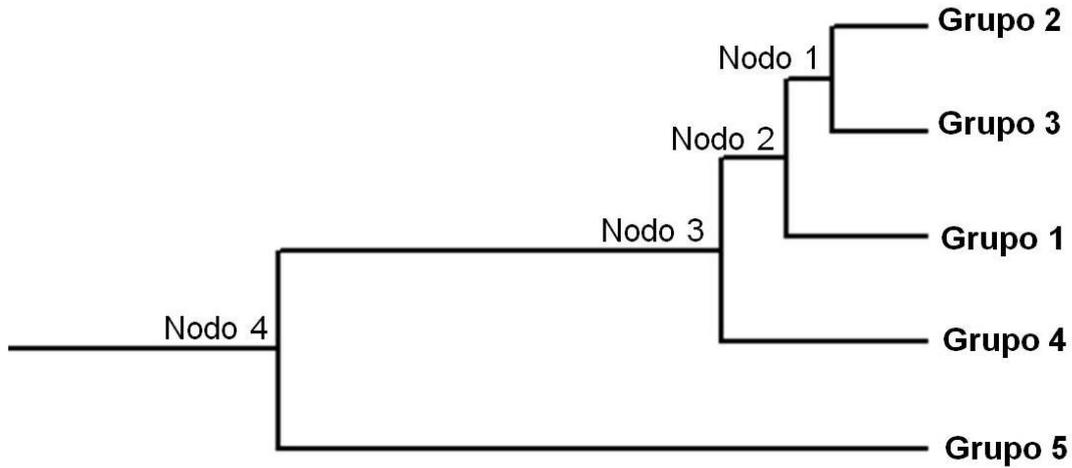
El dendrograma construido para los 5 grupos mediante el método UPGMA y con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones (Figura 4) mostro un alto porcentaje de loci que soportan la formación de nodos (Tabla 7) lo que indica una alta confiabilidad para los loci utilizados en el análisis de diversidad genética.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

Figura 4. Dendrograma para los cinco grupos evaluados y construido mediante el método UPGMA con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones usando el programa TFPGA.



El dendrograma confirma que los materiales colombianos evaluados forman un grupo que se puede discriminar fácilmente de los materiales procedentes del Perú.

Tabla 7. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de los cuatro grupos formados.

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

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

CONCLUSIONES

La información de los patrones de bandas obtenidos permitió estimar parámetros de diversidad, mostrando alta diversidad genética en los materiales del Perú frente a las 23 poblaciones de *Guadua angustifolia* Kunth evaluadas para el Eje Cafetero de Colombia.

Las pruebas de correlación entre distancias genéticas y distancias geográficas encontradas entre los grupos de Colombia y Perú fueron evidentemente suficientes para proponer que existe genética asociada a ubicación geográfica.

Dado el conjunto de resultados obtenidos en este estudio, los grupos evaluados de *Guadua angustifolia* en el eje cafetero de Colombia podrían ser considerados una sola población que intercambian una buena proporción de información genética, mientras que los materiales evaluados del Perú muestran una distancias genética y distancia geográficas suficiente para proponer que pueden ser considerados una estructura poblacional diferente asociada a ubicación geográfica.

RECOMENDACIONES

Se recomienda realizar estudios de diversidad genética y estructura poblacional que involucren más representantes de poblaciones naturales de la zona de estudio en Perú y también involucrar una zona geográfica más amplia del país para concluir de manera más precisa sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones naturales de *Guadua angustifolia* Kunth.

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

BIBLIOGRAFIA

CAMPOS, H., SEGUER, I. 2000. Biotecnología y recursos genéticos vegetales. *Agro Sur* 28 (1) 13-24.

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., & X. LONDOÑO. 2011. Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agro-industriales en el eje Cafetero. Sexto informe Proyecto MADRA2008M6336-3616. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

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

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.

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

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

TORRES, M.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. Trabajo de grado. Universidad del Valle. Pp 63

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

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

ANEXOS

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

Muestra	Grupo	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	1	1	1	2	2	2	3		
A2	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	3	1	1	1	2	2	2	3			
A3	2	2	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	3	1	1	1	2	3	4				
B1	2	1	3	2	3	1	2	1	2	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	3	4				
B2	2	1	3	2	3	1	2	1	1	1	1	2	2	1	2	2	1	2	2	2	2	3	3					
B3	2	1	3	2	3	1	2	1	2	1	1	2	2	1	3	1	2	2	1	3	1	2	3	4				
C1	2	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	3	1	3	1	2	3	4							
C2	2	1	3	2	3	1	1	1	1	1	1	3	3	1	3	2	2	3	4									
C5	2	1	3	3	3	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	2	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	3	4									
E4	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	3	1	2	1	2	3	4									
E5	2	1	3	2	3	1	1	1	2	1	1	2	2	1	2	1	3	3	4									
F1	2	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4									
F2	2	1	3	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4									
G1	2	1	1	2	3	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4									
G2	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4									
G3	2	1	1	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	2	3	4									
H1	1	1	4	2	3	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4									
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									
I1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	3	3	1	1	1	3	2	3	4								
I2	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	1	3	3	1	2	1	1	2	3	4								
I3	2	2	3	2	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	1	1	1	2	3	4								
J1	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	1	1	1	2	3	4								
J2	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	2	1	2	2	3	4								
J3	2	2	4	2	2	1	1	1	2	1	1	3	3	1	1	1	2	2	3	4								
K1	2	2	4	1	2	1	1	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	2	3	4								
K2	2	2	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	2	2	1	2	2	3	4								
K3	2	2	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	2	2	1	3	2	3	4								
L1	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	1	1	3	2	3	4								
L2	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	2	3	4								
L3	2	2	3	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	2	3	4								
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									
Ñ1	1	2	4	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	3	2	3	3	4									
Ñ2	1	2	4	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	3	2	3	3	4									
Ñ3	1	2	4	2	3	1	1	1	3	1	1	3	3	1	3	1	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									
O3	1	1	3	2	3	1	1	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4									
P1	2	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	3	1	2	3	4									
P2	2	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	2	3	1	3	1	2	3	4									
P3	2	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4									
Q1	3	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	3	4									
Q2	3	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	3	3	4									
Q3	3	1	2	2	3	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4									

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).

R1	3	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
R2	3	1	4	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
R3	3	1	1	1	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	2	2	2	3	4
S11	3	2	3	1	2	1	2	1	3	1	2	2	3	1	2	2	2	3	4
S10	3	2	4	1	2	1	2	1	3	1	1	3	3	1	2	2	3	3	4
S12	3	2	3	1	2	1	1	1	3	1	1	3	3	1	2	3	3	3	4
T1	3	1	1	1	2	1	2	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
T2	3	1	3	2	2	1	1	1	3	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
T3	3	1	3	1	2	1	1	1	3	1	2	2	3	1	2	1	3	3	4
U1	4	1	3	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	4
U2	4	1	3	1	2	1	1	1	1	1	2	1	2	1	2	1	3	3	4
U3	4	1	3	2	3	1	1	1	1	2	2	1	2	1	3	1	3	3	4
V1	4	1	3	2	3	1	2	1	1	1	2	1	3	1	3	1	3	2	4
V2	4	1	2	2	3	1	1	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
V3	4	1	3	2	2	1	2	1	1	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
W1	4	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	3	3	4
W2	4	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	2	3	4
W3	4	2	2	1	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	3	1	2	3	4
X1	4	1	2	3	3	1	1	1	2	2	2	1	3	1	2	1	2	1	4
X2	4	1	2	3	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	3	1	4
X3	4	1	2	3	3	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2	1	3	1	4
Y1	4	1	2	2	3	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	3	1	3
Y2	4	1	2	3	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	3	1	3
Y3	4	1	2	2	3	1	1	1	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	3
Z1	4	1	1	2	3	2	2	1	2	1	2	1	3	1	2	1	2	3	4
Z2	4	1	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	3	1	2	1	2	3	4
Z3	4	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	1	3	1	2	1	3	3	4
α1	3	1	3	2	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1	1	1	3	3	4
α2	3	1	3	2	2	1	1	2	2	1	1	2	3	1	1	1	3	3	4
α3	3	1	3	1	2	1	1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	3	3	4
β1	2	1	2	2	4	1	1	2	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4
β2	2	1	2	2	4	1	1	2	2	1	1	3	3	1	2	1	3	3	4
β3	2	1	2	2	4	1	2	2	2	2	2	3	3	1	2	1	3	3	4
σ1	2	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	3	3	4
σ2	2	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	1	3	2	4
σ3	2	2	4	2	4	1	2	2	2	1	1	2	3	1	2	2	2	2	4
PE1	5	1	3	3	4	1	1	2	3	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3
PE2	5	1	3	3	4	1	1	2	3	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3
PE3	5	1	3	3	4	1	1	2	2	1	1	3	3	1	3	2	2	2	3

¹ Parte del Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento;

² Doctor en Ciencias Agropecuarias, docente Universidad Nacional sede Palmira;

³ Presidenta Sociedad Colombiana del Bambú y consultora del Proyecto PD428/06 Rev.2 (F).