# “GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES RAMs (Microsatélites amplificados al azar) y MULTIPLICACIÓN DE MATERIALES SUPERIORES DE *Guadua angustifolia* Kunth”

PAULA ANDREA RUGELES SILVA

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

# “GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES RAMs (Microsatélites amplificados al azar) y MULTIPLICACIÓN DE MATERIALES SUPERIORES DE *Guadua angustifolia* Kunth”

PAULA ANDREA RUGELES SILVA

Tesis de grado presentada como requisito parcial para optar al título de:
Magister en Ciencias con Énfasis en Recursos Fitogenéticos Neotropicales

Director:
NANCY BARRERA MARÍN
Ph.D. en Biología

Asesor:
JAIME EDUARDO MUÑOZ F.
Ph.D. (c)

Grupo de Investigación en Diversidad biológica

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
## LINEA DE INVESTIGACIÓN
## RECURSOS FITOGENETICOS NEOTROPICALES

En Palmira a los 27 días del mes de Mayo de 2011, se reunió en esta Sede el Jurado Calificador de Tesis, integrado por los doctores CREUCI MARIA CAETANO y JHON ALBEIRO OCAMPO PEREZ

Para calificar la Tesis de Grado de:

# PAULA ANDREA RUGELES SILVA

Titulada:

**"GENOTIPIFICACIÓN MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES RAMs (Microsatelites amplificados al azar) Y MULTIPLICACIÓN DE MATERIALES SUPERIORES DE *Guadua angustifolia* Kunth"**, bajo la dirección de Nancy Barrera Marín, Ph.D.

Después de oír el informe del jurado evaluador compuesto por los doctores CREUCI MARIA CAETANO y JHON ALBEIRO OCAMPO PEREZ , y de haber cumplido con el proceso de evaluación, la tesis fue calificada como:

APROBADO X

REPROBADO ___

CREUCI MARIA CAETANO

JHON ALBEIRO OCAMPO PEREZ

## DEDICATORIA

A mis padres Alvaro y Judith, porque a pesar que ahora no están juntos, me dieron las bases de mi educación y gracias a eso, ahora culmino con otra de mis metas. A mi madre por ser la persona especial que siempre ha estado ahí, mi consejera y mi apoyo en los momentos difíciles de mi vida, por enseñarme que siempre se puede salir adelante.

A mi Hijo Matías por que Él es la luz de mi vida, la chispa que impulsa este motor, por Él y por mi culmino esta etapa de mi vida, para que un día se sienta orgulloso de su madre.

A mis hermanos Carlos y Carolina, porque ellos son parte de la base familiar, porque siempre los llevo en mi mente y mi corazón, porque saben que pueden contar con migo y yo con ellos.

A Baude por ser el amor de mi vida, el hombre que me ha dado lo más hermoso, una familia, un hijo, su amor y comprensión, por ese apoyo incondicional y por la paciencia que siempre me ha tenido.

## AGRADECIMIENTOS

Al profesor Jaime Eduardo Muñoz por su apoyo y por creer en mi trabajo para la finalización exitosa del proyecto, sin su apoyo, no hubiese sido posible la culminación de esta etapa.

Al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural por la financiación de esta investigación, a la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira y al grupo de Investigación en Diversidad Biológica.

A Ximena Londoño de la Pava por su amistad y por todas las enseñanza dadas sobre la guadua, por su apoyo y por sus constantes intercambios de información.

A Andres Mauricio Posso, primero por su colaboración en toda la parte de laboratorio e interpretación y análisis de los resultados y segundo por su valiosa amistad.

A Jeisson Gallego por sus conocimientos en la utilización de la técnica molecular.

A todos y cada uno de los estudiantes e investigadores del Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

A mi familiares y amigos por que aunque muchos están lejos se que de corazón siempre me apoyaron.

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

Articulo 24, resolución 04 de 1974

**CONTENIDO**

Pág.

INTRODUCCIÓN GENERAL ....18
OBJETIVOS ....19
General ....19
Específicos ....19
1. Capítulo I. ....20
GENOTIPIFICACIÓN POR MARCADORES MOLECULARES RAMS (RANDOM AMPLIFIED MICROSATELLITES) MATERIALES SELECCIONADOS DE GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH ....20
INTRODUCCIÓN ....21
1.1. ESTADO DEL ARTE....23
1.2. MATERIALES Y MÉTODOS....34
1.2.1. Área de estudio ....34
1.2.2. Colecta de germoplasma....35
1.2.3. Genotipificación con marcadores moleculares ....36
1.2.3.1. Extracción del ADN ....36
1.2.3.2. Evaluación de cantidad y calidad de ADN....37
1.2.3.3. Metodología para marcadores moleculares tipo RAMs....37
1.2.3.3.1. Análisis de datos....38
1.2.3.4. Genotipificación de materiales superiores....40
1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ....41
1.3.1. Distribución de los sitios de colecta....41
1.3.2. Extracción de ADN ....41
1.3.3. Genotipificación por marcadores moleculares RAMs ....43
1.3.3.1. Coeficiente de diferenciación genética (Fst) ....48
1.3.3.2. Análisis descriptivo....49
1.3.3.3. Distancia genética....51
1.3.3.4. Análisis de varianza molecular....52
1.3.3.5. Genotipificación de materiales superiores....53
1.3.3.5.1. Marcadores moleculares RAMs....54
1.3.3.5.2. Análisis descriptivo ....61
1.4. CONCLUSIONES....63
BIBLIOGRAFÍA ....64

2. CAPITULO II ....72
MULTIPLICACIÓN DE MATERIALES SUPERIORES DE *Guadua angustifolia* Kunth, Y ESTABLECIMIENTO DEL DUPLICADO DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE GUADUA....72
INTRODUCCIÓN ....73
2.1 ESTADO DEL ARTE....73
2.1.1. Generalidades ....74
2.1.1.1. Composición botánica ....74
2.1.1.1.1. El rizoma ....74
2.1.1.1.2. Las raíces....75
2.1.1.1.3. El tallo ....75
2.1.1.1.4. Las ramas ....75
2.1.1.1.5. Las hojas....76
2.1.1.1.6. La semilla ....77
2.1.1.1.7. Las flores....77
2.1.1.2. Beneficios ambientales....78
2.1.1.2.1. Diversidad ....78
2.1.1.2.2. Protección del suelo....79
2.1.1.2.3. Calidad y cantidad de agua....79
2.1.1.2.4. Captura de carbono....80
2.1.1.3. Reproducción ....80
2.1.1.3.1. A partir de plántulas (chusquines) de *Guadua angustifolia* ....82
2.1.1.3.2. Propagación por el método de ramas basales o "riendas laterales". .82
2.1.2. Las fases de desarrollo de un guadual ....83
2.1.2.1. Renuevo ....84
2.1.2.2. Estadio juvenil ....84
2.1.2.3. Estadio maduro ....85
2.1.2.4. Estadio sobremaduro y seco ....85
2.1.3. Bancos de germoplasma ....85
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS....87
2.2.1. Área de estudio....87
2.2.1.1. Área de estudio de los materiales superiores....87
2.2.1.2. Área de estudio del duplicado del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Juan María Céspedes....89

2.2.2. Fases de trabajo ..... 89
2.2.2.1. Colecta de materiales ..... 90
2.2.2.2. Establecimiento en vivero ..... 90
2.2.2.3. Establecimiento en campo ..... 90
2.2.2.4. Elaboración de planos ..... 91
2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN ..... 92
2.3.1. Materiales superiores ..... 92
2.3.2. Duplicados del Jardín Botánico Juan María Céspedes ..... 96
2.3.3. Elaboración de planos ..... 98
2.4. CONCLUSIONES ..... 101
BIBLIOGRAFÍA ..... 102
ANEXOS ..... 105

## LISTA DE FIGURAS

Pág.

Figura 1. Descripción morfológica de la *Guadua angustifolia* Kunth..... 25
Figura 2. Continuación Descripción morfológica de la *Guadua angustifolia* Kunth. ..... 26
Figura 3. Mapa de la distribución potencial del genero *Guadua*. ..... 29
Figura 4. Mapa de distribución potencial de *Guadua angustifolia* Kunth. ..... 31
Figura 5. Colecta de material para extracción de ADN de guadua. ..... 36
Figura 6. Extracción de ADN de guadua ..... 36
Figura 7. ADN total de guadua teñido con bromuro de etidio ..... 37
Figura 8. ADN diluido de guadua teñido con bromuro de etidio ..... 37
Figura 9. Mapa de distribución de los sitios de colecta de germoplasma de guadua en la eco-región Cafetera. ..... 41
Figura 10. ADN total de guadua extraído con el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) ..... 42
Figura 11. ADN de guadua extraído con el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) purificado con fenol – cloroformo ..... 43
Figura 12. Heterocigosidad esperada (He) y Porcentaje de loci polimórficos. ..... 45
Figura 13. Mapa con las agrupaciones para estudio de diversidad genética de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero. ..... 46
Figura 14. Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud de Dice. ..... 50
Figura 15. Dendrograma de las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua. ..... 52
Figura 16. Porcentajes de variación del análisis de varianza molecular para los cuatro grupos de Guadua. ..... 53
Figura 17. Mapa de los nueve materiales superiores de *G. angustifolia*. ..... 54
Figura 18. Gel de poliacrilamida Cebador TG, con tinción con bromuro ..... 56

Figura 19. Gel de poliacrilamida Cebador CA, con tinción con bromuro ..... 56
Figura 20. Gel de poliacrilamida Cebador CT, con tinción con bromuro..... 57
Figura 21. Gel de poliacrilamida Cebador CCA, con tinción con bromuro..... 57
Figura 22. Gel de poliacrilamida Cebador TG, con tinción con bromuro ..... 58
Figura 23. Gel de poliacrilamida Cebador CGA, con tinción con bromuro..... 58
Figura 24. Valores de heterocigosidad de los materiales superiores y los 23 sitios de muestreo ..... 60
Figura 25. Porcentaje de Loci polimórficos de los materiales superiores y los 23 sitios de muestreo ..... 60
Figura 26. Dendrograma de los materiales superiores de *G. angustifolia.* ..... 62
Figura 27. Diferentes formas de rizoma en la guadua.. ..... 74
Figura 28. Culmos de guadua.. ..... 75
Figura 29. Ramas o riendas de las guaduas.. ..... 76
Figura 30. Hojas lanceoladas y caulinares de *G. angustifolia.* ..... 76
Figura 31. Semilla de *G. angustifolia* ..... 77
Figura 32. Inflorescencia de la *G. angustifolia.* ..... 78
Figura 33. Fases de desarrollo de un guadual. ..... 83
Figura 34. Tres variedades de *G. angustifolia* descritas para Colombia.. ..... 87
Figura 35. Distribución geográfica de los materiales superiores de guadua en el Eje Cafetero.. ..... 89
Figura 36. Colecta de chusquines de materiales superiores para multiplicación vegetativa. ..... 92
Figura 37. Establecimiento en vivero de los materiales superiores. ..... 92
Figura 38. Brotes nuevos de los materiales en vivero. ..... 93
Figura 39. Comportamiento de los materiales en el tiempo de acuerdo a la procedencia.95

Figura 40. Establecimiento en vivero del Eje Cafetero de los materiales superiores de *G. angustifolia.* ..... 96

Figura 41. Ensayo de rendimiento con los materiales superiores de *G. angustifolia* en el Municipio de Montenegro, Quindío. ..... 96

Figura 42. Siembra de duplicados del Banco de Germoplasma de Bambúes del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá. ..... 98

Figura 43. Plano del banco de germoplasma de bambúes del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá, Valle del Cauca. ..... 99

Figura 44. Plano del lote de siembra de los duplicados del banco de germoplasma del Jardín Botánico de Tuluá en La Hacienda EL Paraíso, Cerrito – Valle del Cauca. ..... 100

## LISTA DE TABLAS

Pág.

Tabla 1. Sitios de muestreo en los departamentos del Eje Cafetero. ..... 34

Tabla 2. Cebadores RAMs. Las siguientes designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T) ..... 37

Tabla 3. Condiciones de amplificación para RAMs utilizados en la investigación..... 38

Tabla 4. Perfil térmico de amplificación para RAMs utilizado en la investigación. ..... 38

Tabla 5. Materiales superiores de *G. angustifolia* seleccionados. ..... 40

Tabla 6. Características del cebador, número de bandas por cebador, heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para los 69 individuos de guadua evaluados.44

Tabla 7. Agrupaciones para análisis de diversidad genética de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero..... 46

Tabla 8. He y porcentaje de loci polimórficos para los cuatro grupos formados de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero. ..... 48

Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al Fst propuesta por Wright (1978) ..... 48

Tabla 10. Distancias genéticas entre las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua. ..... 51

Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua..... 52

Tabla 12. Análisis de varianza molecular para los cuatro grupos formados. ..... 53

Tabla 13. Número de bandas de los materiales superiores obtenidas con los 6 cebadores RAMs..... 55

Tabla 14. Valores de heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos de los materiales evaluados. ..... 59

Tabla 15. Ubicación geográfica de los materiales superiores de guadua en el Eje Cafetero. ..... 88
Tabla 16. Análisis de varianza para la variable N° de brotes. ..... 94
Tabla 17. Prueba de Duncan para la variable de respuesta N° de brotes. ..... 94
Tabla 18. Accesiones del Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes, Mateguadua, Tuluá. ..... 97

## LISTA DE ANEXOS

Pag.

Anexo A. Protocolo de dellaporta (modificado) para extracción de ADN ..... 105

Anexo B. Protocolo de dellaporta con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico para extracción de ADN ..... 106

Anexo C. Prueba Exacta (Raymond and Rusell, 1995) ..... 108

Anexo D. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas con seis marcadores moleculares RAMs en 45 muestras de los materiales superiores de Guadua angustifolia Kunth. ..... 109

## RESUMEN

La Guadua (*Guadua angustifolia* Kunth) es una especie natural de bambú que crece en el Neotropico. Esta especie se distribuye en Colombia 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, tiene gran importancia agroindustrial en la región cafetera por su utilización en construcción, preindustrialización y muebles y artesanías, a partir de los datos obtenidos en el proyecto "Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia", se evaluaron 23 sitios de muestreos en la eco-región cafetera de Colombia donde se incluyeron los nueve materiales superiores de guadua seleccionados por características morfológicas y físico mecánicas, se realizó la genotipificación con la técnica molecular RAMs (*Random Amplified Microsatellites*), con este marcador molecular se obtuvo una he de 0.328 y un porcentaje de loci polimórfico de 84,95%, para toda la población y he de 0.31 con un porcentaje de loci polimórfico de 81.03% para los nueve materiales superiores, lo que indica una alta diversidad de alelos en toda la población y los materiales superiores. El valor de Fst encontrado fue de 0.1771 mostrando una alta diferenciación genética. También se estableció un duplicado con 38 accesiones del Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes, Mateguadua, Tuluá, en inmediaciones de la Hacienda el Paraíso en el Cerrito.



Palabras claves: RAMs, Materiales superiores, Genotipificación y Banco de Germoplasma

## ABSTRACT

*Guadua angustifolia* Kunth is a bamboo specie distributed in tropical central and south America. In Colombia is distributed in Caldas, Quindío, Risaralda, Valle del Cauca, Antioquia, Boyacá, Cauca, Caquetá, Casanare, Cundinamarca, Chocó, Huila, Meta, Nariño, Norte de Santander, Putumayo, Santander and Tolima departments, has an great industrial importance in the Colombian coffee region due its utilization in houses construction, pre – industrialization and furniture. Using data obtained with the project "Selection, genotyping and multiplication of superior materials of *Guadua angustifolia* Kunth with industrial purposes in the Colombian coffee region", 23 collecting sites were evaluated and included 9 superior materials selected by morphologic and physics mechanic characteristics. Genotyping using RAMs (*Random Amplified Microsatellites*) were done. It shown an he value of 0,328 and a polymorphic loci percentage of 84,95% for the complete population and he=0,31 and %=81,03 for the 9 selected materials, indicating high allele diversity for the complete population and selected materials. The Fst value was 0,1771 showing high genetic differentiation among populations.

A duplicate was established with 38 accessions from the Bambusoidaeae germplasm bank of the Juan Maria Céspedes botanical garden, Mateguadua, Tuluá, in the Paraiso Farm, Cerrito municipality.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La Guadua es una especie natural de bambú en las regiones tropicales en la América Central y América del Sur. Crece en bosques naturales, predominantemente a lo largo de ríos como bosques puros o mezclado con árboles. Cada vez más, los bosques de Guadua son establecidos artificialmente sobre las tierras que habían sido antes empleadas con otros cultivos como el pasto o el café. Son bosques típicos en la Región Cafetera de Colombia, relativamente pequeños y de forma irregular, forman un modelo sumamente fragmentado. (Kleinn & Morales, 2006)

Los culmos de guadua tradicionalmente han sido usados para muchos objetivos, como la construcción y la artesanía. La utilización de la Guadua como materia prima natural renovable puede ser mejorada y tarde o temprano convertirla en una alternativa económica para agricultores, en particular en la Región del Eje Cafetero. (Kleinn & Morales, 2006)

La especie *G. angustifolia* se distribuye en Colombia 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, 2004a).

Pero es en la región conocida como Eje Cafetero (Caldas, Quindío. Risaralda, Tolima y Valle) la que alberga la mayor concentración en guaduales (26,986 ha) y la mayor apropiación cultural y desarrollo económico de la especie. (Morales & Kleinn, 2004; Castaño & Moreno, 2004; Moreno, 2006).

Esta propuesta esta vinculada 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” que viene desarrollando la Universidad Nacional de Colombia y el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, dentro del proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia” (Muñoz *et al.,* 2008), también hace parte del proyecto de doctorado del Profesor Jaime Eduardo Muñoz Florez.

Este trabajo esta presentado en dos capítulos, el primero con todos los datos de la genotipificación de los materiales de Guadua, y el segundo con los datos de multiplicación de los materiales superiores de *G. angustifolia* y los duplicados del banco de germoplasma del jardín botánico Juan María Céspedes de Tuluá.

## OBJETIVOS

### General

Multiplicar y Genotipificar materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con marcadores moleculares RAMs seleccionados para su uso en la industria, construcción, preindustrialización, muebles y artesanías.

### Específicos

- Genotipificar con marcadores moleculares RAMs (Random Amplified Microsatellites) materiales seleccionados de *Guadua angustifolia*.

- Multiplicar materiales superiores de *Guadua angustifolia* de alta calidad y productividad, para conservarlos y contribuir con la propagación masiva de los mismos.

# 1. Capítulo I.

## GENOTIPIFICACIÓN POR MARCADORES MOLECULARES RAMS (RANDOM AMPLIFIED MICROSATELLITES) MATERIALES SELECCIONADOS DE GUADUA ANGUSTIFOLIA KUNTH

## INTRODUCCIÓN

En América hay una gran variedad de bambúes, aproximadamente 400 especies, los bambúes del nuevo mundo incluyen las subtribus Guaduinae (con los géneros *Guadua, Otatea* y *Olmeca*), Chusqueinade) con los géneros *Chusquea* y *Neurolepis*) y Arthrostylidiinae. *Guadua angustifolia* Kunth es uno de los bambúes leñosos más conocidos y utilizados en América (Marulanda & Uribe, 2010).

La especie G*. angustifolia*, posee un grado de variabilidad genética importante, expresada a nivel fenotípico, la cual ha sido posible diferenciar de acuerdo a características morfológicas, taxonómicas y observaciones de comunidades locales. A partir de esta información se han caracterizado y establecido diferentes biotipos de Guadua en Colombia como son macana, castilla, cebolla, cotuda y grandicaula (Gómez *et al.*, 2001). Según Londoño (1989) y Londoño & Clark (1998) los biotipos son formas que responden más a cambios en las condiciones de suelo y clima, que a variaciones taxonómicas.

En Colombia, los guaduales se encuentran concentrados en la región central de los Andes (Cordilleras Central y Occidental) generalmente entre los 1000 y 1500 m.s.n.m. Se han reportado 70 especies, lo cual posiciona a este país como el segundo centro de diversidad de la especie, después de Brasil (Londoño, 1990 & Clark 2002).

Esta especie es un bambú gigante, que crece hasta 30 metros, tiene propiedades mecánicas muy sobresalientes y con culmos que mucha durabilidad. Juega un papel importante en la construcción de vivienda y en la economía rural (Londoño, 1998; Rao & Rao, 1995, 1998).

En Colombia, los guaduales se concentran en la región central de los Andes, donde los bosques nativos y naturales han sido talados y deforestados, conllevando a una fuerte presión sobre los guaduales y la destrucción general de sus hábitats, provocando la disminución de sus áreas naturales, afectando su ecosistema y la diversidad genética de la especie. (Marulanda & Gutierrez, 2010)

La reproducción sexual de la guadua, si bien garantiza el mantenimiento de su diversidad genética, presenta grandes dificultades debido a que la especie florece anualmente después de un periodo seco, la obtención de semillas es difícil debido a que un alto porcentaje de las inflorescencias son parasitadas en estados inmaduros, impidiendo conservar las semillas a largo plazo. Y aunque los porcentajes de germinación de las semillas está entre un 95 y 100%, es muy difícil la obtención de una cantidad suficiente de forma regular (Gómez & Agudelo, 2003).

Debido a los ciclos sexuales inusualmente largos, la identificación del bambú depende de descriptores morfológicos, por esto los marcadores moleculares representan una herramienta poderosa para apoyar la clasificación e identificación de bambúes en todo el mundo. Los marcadores basados en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa) están bien documentados, han sido utilizados en cientos de especies vegetales de casi todas

las familias botánicas y es posible utilizarlos para identificación de especies y caracterización de cultivares (Khasa & Dancik, 1996; Samec & Nasinec, 1996; Raina *et al*., 2001; Johnson *et al.*, 2003).

Los marcadores moleculares ofrecen importantes oportunidades para diferentes propósitos en la investigación en las plantas, desde el descubrimiento de la tecnología de la PCR las técnicas basadas en el análisis de ADN han avanzado rápidamente; en bambú, se han utilizado una amplia gama de marcadores tales como proteínas, quimo – taxonomía con moléculas volátiles y marcadores basados en la restricción enzimática del ADN, como los marcadores RFLP (Restriction Fragment Lengnth), DNA-cp (ADN cloroplasto) y DNA-mt (ADN mitocondrial) Gielis *et al.* (1997b.)

Entre las técnicas disponibles para estudiar la diversidad genética vegetal se encuentran los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), microsatélites y los RAMs (Random Amplified Microsatellites). En los últimos diez años los microsatélites han cobrado importancia en estudios que van desde caracterización individual hasta mapeo genómico. Debido al alto nivel de polimorfismo, carácter codominante, facilidad de aplicación y alta reproducibilidad son marcadores ampliamente utilizados y muy informativos. En la identificación de individuos estrechamente relacionados, clones o cultivares se estima que los microsatélites tienen poder de discriminación siete veces mayor que los RAPD (Kraic *et al*., 1998) y se consideran los marcadores ideales para estudios de mapeo de ligamiento (Hearne *et al.,* 1992; Morgante y Olivieri, 1993) y evolutivos.

Los Microsatélites Amplificados al Azar (RAM) se utilizan en caracterización de diversidad genética en microorganismos, animales y plantas. La revisión describe la técnica RAM, analiza los elementos asociados con la técnica (calidad, cantidad de ADN, condiciones de amplificación, electroforesis, análisis estadístico) y presenta la aplicación de la técnica en mora *Rubus spp*, Uchuva *Physallis peruviana*, guayaba *Psidium guajava* y heliconias *Heliconia* spp. (Muñoz *et al.,* 2008)

Con los marcadores RAM se estudian poblaciones (Hantula, *et al.,* 1996), se mide diversidad genética en plantas y animales, se muestra la base de la variación de los individuos, se permite seleccionar regiones del ADN, se permite analizar la información que se expresa y la que no se expresa ya que el número de polimorfismos detectables es teóricamente ilimitado (Mahuku *et al.,* 2002).

Trabajos sobre caracterización de diversidad genética vegetal sugieren que la técnica RAM es útil para identificar duplicados en bancos de germoplasma, para establecer grupos o asociaciones entre individuos de una población de acuerdo con la especie, localización geográfica, relaciones filogenéticas, entre otras. (Muñoz *et al.,* 2008)

El objetivo de este trabajo es Genotipificar por medio de marcadores moleculares RAMs (Microsatélites amplificados al azar) nueve materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth, seleccionados a partir del proyecto "Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia".

## 1.1. ESTADO DEL ARTE

### 1.2.1. Aspectos generales de la *Guadua angustifolia* kunth.

#### 1.1.1.1. Clasificación taxonómica

El bambú es una gramínea, botánicamente se clasifica en los Cormofitos, dentro de la subdivisión de los espermatofitinios (Fanerógamas), Las Gramíneas Bambusoides, morfológicamente se encuentran en el grupo de las plantas leñosas. (Young & Judd, 1992)

| | |
|---|---|
| Reino: | Plantae |
| División: | Magnoliophyta |
| Clase: | Equisetopsida C. Agardh |
| Subclase: | Magnoliidae Novák ex Takht. |
| Superorden: | Lilianae Takht. |
| Orden: | Poales Small |
| Familia: | Poaceae Barnhart |
| Subfamilia: | Bambusoideae |
| Tribu: | Bambuseae |
| Subtribu: | Guaduinae |
| Género: | ***Guadua*** Kunth |
| Especie | ***G. angustifolia* Kunth** |

Otras especies:

*Guadua amplexifolia* PresL
*Guadua glomerata* Munro
*Guadua paraguayana* Doell in Martius
*Guadua sacrocarpa* Londoño & Peterson
*Guadua superba* Huber
*Guadua trinii* Nees ex Ruprecht
*Guadua weberbaueri* Pilger
*Guadua uncinata* Londoño & Clark
*Guadua incana* Londoño

#### 1.1.1.2. Morfología de la especie *Guadua angustifolia* Kunth

La *Guadua angustifolia* Kunth es la especie nativa más importante de Colombia. Fue identificada en 1806 por los botánicos Humboldt y Bonpland como *Bambusa guadua.* En 1822 Karl S. Kunth crea el género *Guadua,* haciendo uso del vocablo indígena "guadua", con el que lo identificaban las comunidades indígenas de Colombia y Ecuador. Kunth rebautiza la especie con el nombre de *Guadua angustifolia,* que significa "hoja angosta" (Londoño 2001).

Guadua se puede distinguir de la Bambusoideae otros por su tallos espinosos y hojas grandes, triangulares, bandas blancas de los pelos por debajo y por encima de la línea nodal, y. La palea de la espiguilla con la quilla alada.

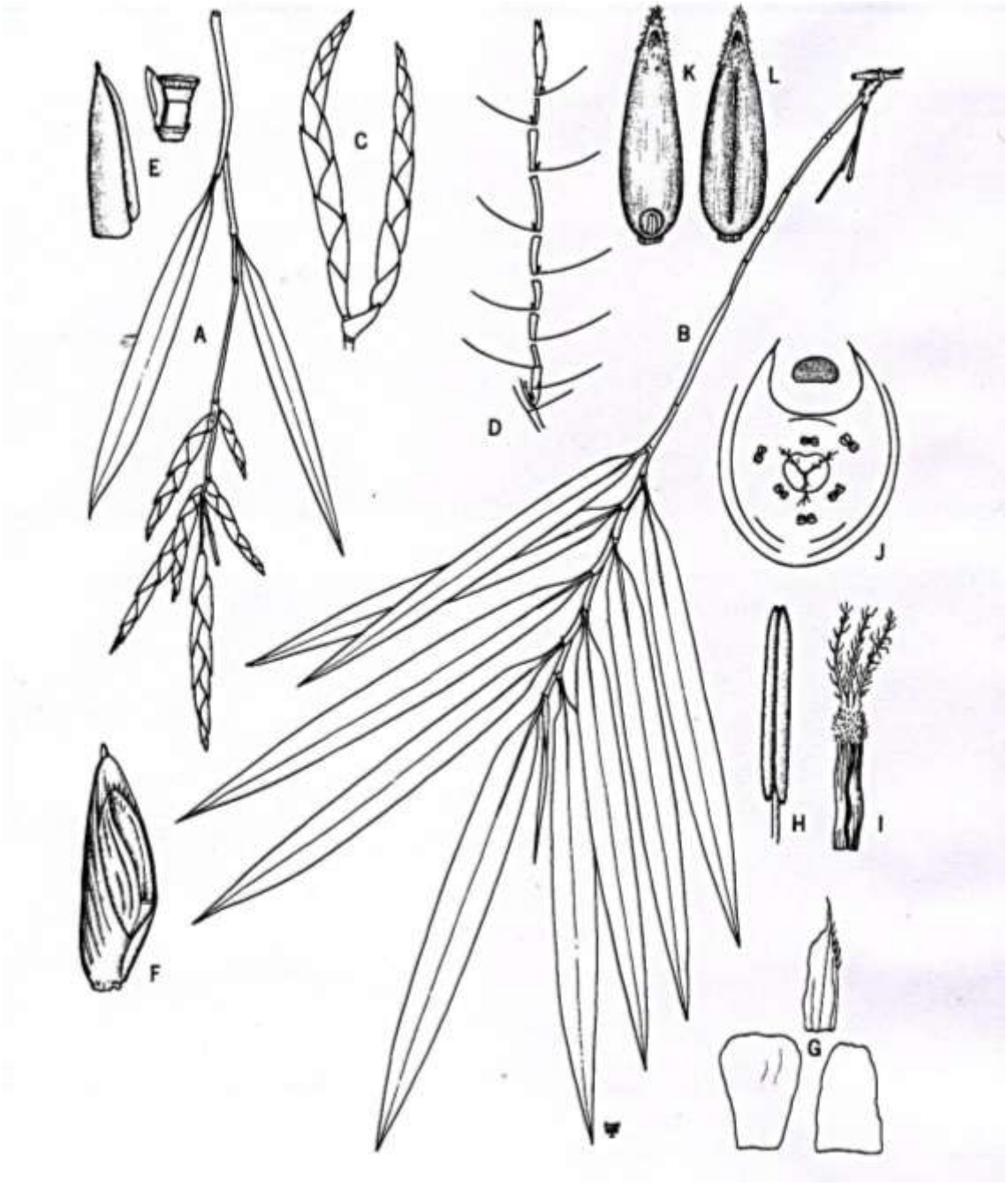



Figura 1. Descripción morfológica de la *Guadua angustifolia* Kunth.
A. Rama florecida, B. Rama estéril, C. Par de pseudoespigas, D. Diagrama de la sección longitudinal de una pseudospigas, E. Bráctea y yema, F. Flósculo, G. Complemento de la lodícula, H. Estambres, I. Diagrama de la sección transversal del flósculo, J. Fruto, lado del embrión, K. Fruto lado del folículo. Fuente: McClure (1973)

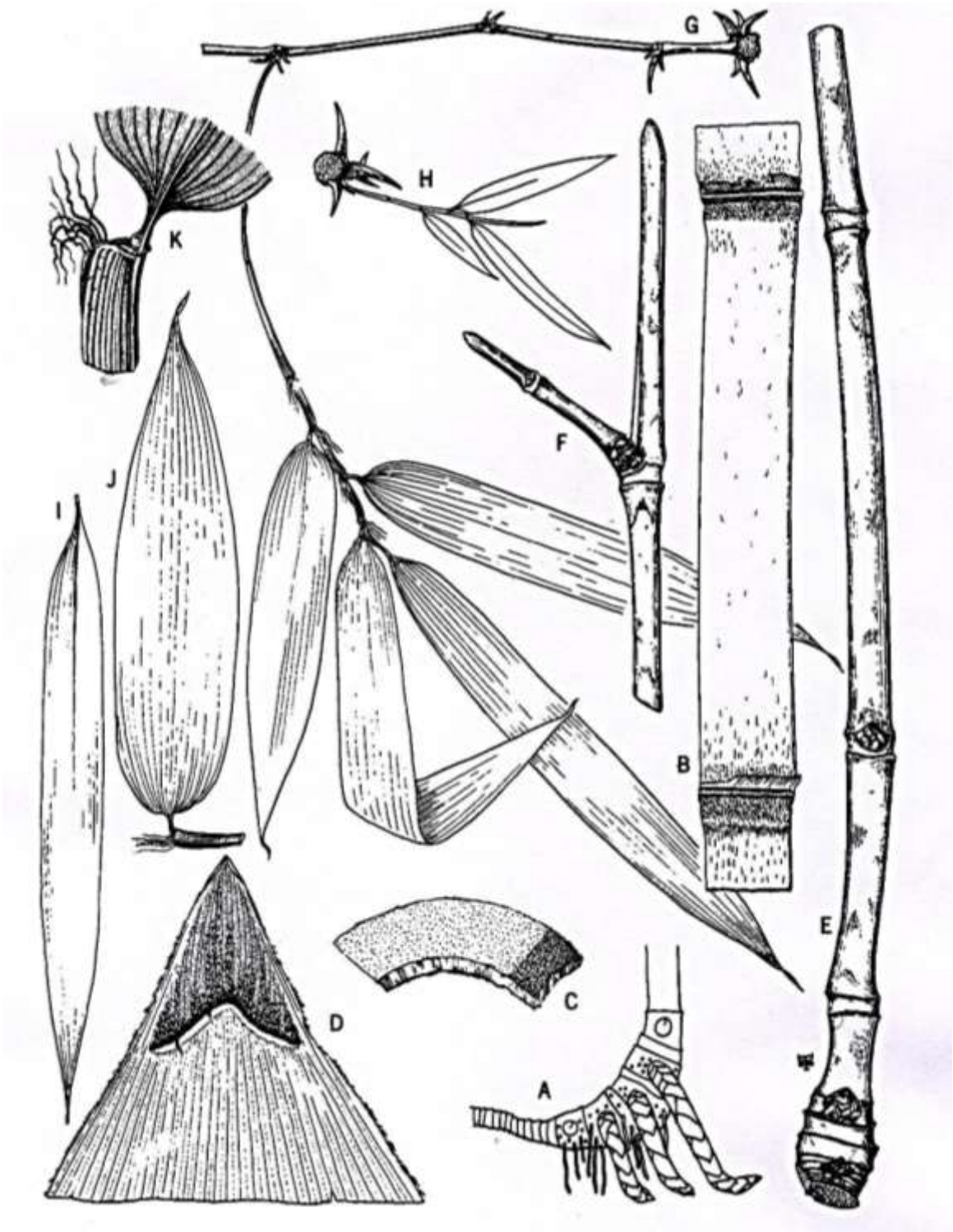



Figura 2. Continuación  Descripción morfológica de la *Guadua angustifolia* Kunth.
A. Base del culmo con rizoma, B. Corte tangencial del internado y nudos, C. Sector de la sección transversal de la pared del tallo, D. Ápice de la bráctea del culmo, vista por el lado interno, E. Parte basal de las primeras ramas de cebador orden de un nudo intermedio del culmo, F. Ramas del segundo orden con yemas intactas, G. Ramas del tercer orden mostrando espina y follaje, H. Complemento de la espina con una rama que sale del nudo

más próximo a la espina, I Y J. Ejemplos de formas de hojas, K. ápices de la bráctea de la hoja y base de la misma. Fuente: McClure (1973)

#### 1.1.1.3. Nombres comunes

Paraguay: takuruasu, Argentina y Uruguay: takuarusu, tacuara, Brasil: taquaruçu, Colombia: guadua, caña brava, caña mansa, garipa, Ecuador: caña brava, caña mansa, guadua, Perú: guadua, ipa, marona, Venezuela: juajua, puru puru, América Central: tarro, otate (Hidalgo 1974).

#### 1.1.1.4. Origen

La especie *G. angustifolia* tiene su origen en Colombia, Ecuador y Venezuela, (Londoño 2000). Ha sido introducida a México y varios países centroamericanos, Isla del Caribe, Hawai y Asia (Soderstrom *et al.*, 1988).

En Colombia se han descrito dos variedades: *G. angustifolia* var. *bicolor* Londoño y *G. angustifolia* var. *nigra* Londoño. Según Giraldo y Sabogal (1999), y Gómez *et al.* (2001) existen biotipos o formas en la especie; “cebolla”, “macana”, “cotuda” y “castilla”, las que son producto de la interacción de factores ambientales.

#### 1.1.1.5. Distribución y ecología

Hay aproximadamente 90 géneros y 1100 especies de bambú en el mundo (McClure 1960; Soderstrom *et al*., 1988; Clark 1990a). De este total, 42 géneros y 547 especies se encuentran en las Américas, lo que representa más o menos el 50% de la diversidad de especies en todo el mundo. Se distribuyen desde los Estados Unidos, a través de Centro y Sur América, incluyendo la región del Caribe, al sur de Chile, y desde el nivel del mar hasta por encima de 4000 m en tierras alto andinas.

En el neotropico, el más alto endemismo se encuentra en el bosque costero del sur de Bahía, lo que representa el 53% de todos los géneros del Nuevo Mundo de bambú herbáceo, de las cuales 27 especies son endémicas. Cuba tiene tres géneros endémicos (*Ekmanochloa, Mniochloa* y *Piresiella*) y cinco especies endémicas (Zuloaga et al.1993), y la región del Chocó de Colombia y Panamá tienen un género endémico (*Maclurolyra*) y aproximadamente 11 especies endémicas (Soderstrom *et al*., 1988).

El género *Guadua* incluye 25 especies distribuidas desde San Luís de Potosí, México con *G. velutina* hasta Argentina con *G. trinii*. (Figura 3) a través de todos los países de América Central y del Sur a la Argentina y Uruguay, aproximadamente a 330 de latitud S (G. trinii), a excepción de las Indias Occidentales y Chile (Soderstrom & Londoño 1987, Clark & Londoño 1991b; Londoño 1990, 1992, Young 1992) Se trata principalmente de un género amazónico con el 45% de la diversidad de especies en las cuencas del Amazonas y el Orinoco (Londoño y Judziewicz 1991). La siguiente área más diversa es el centro de Brasil y el este de Bolivia con el 30% de la diversidad de especies, se encuentra desde el

nivel del mar hasta 2200 m., siendo más abundantes y diversos a menor elevación entre 0 a 1500 m. Se presenta en diferentes tipos de hábitats como los bosques tropicales de tierras bajas, sabanas, cerrados, bosques de galería y los bosques montanos bajos. La especie más abundante del género es *G. paniculata* Munro, que se extiende desde México hasta Brasil. Brasil es el país que ocupa el cebador lugar con 137 especies de bambúes leñosos, Colombia el segundo con 70 especies y Venezuela el tercero con 60 especies.

Las especies del género *Guadua* que se encuentran en Colombia son:

- *G. amplexifolia* J. Presl
- *G. angustifolia* Kunth
- *G. angustifolia* var. *bicolor* Londoño; *G. angustifolia* var. *nigra* Londoño
- *G. glomerata* Munro
- *G. incana* Londoño
- *G. macrospiculata* Londoño & L.G. Clark
- *G. paniculata* Munro
- *G. superba* Huber
- *G. uncinata* Londoño & L. G. Clark
- *G. weberbaueri* Pilger

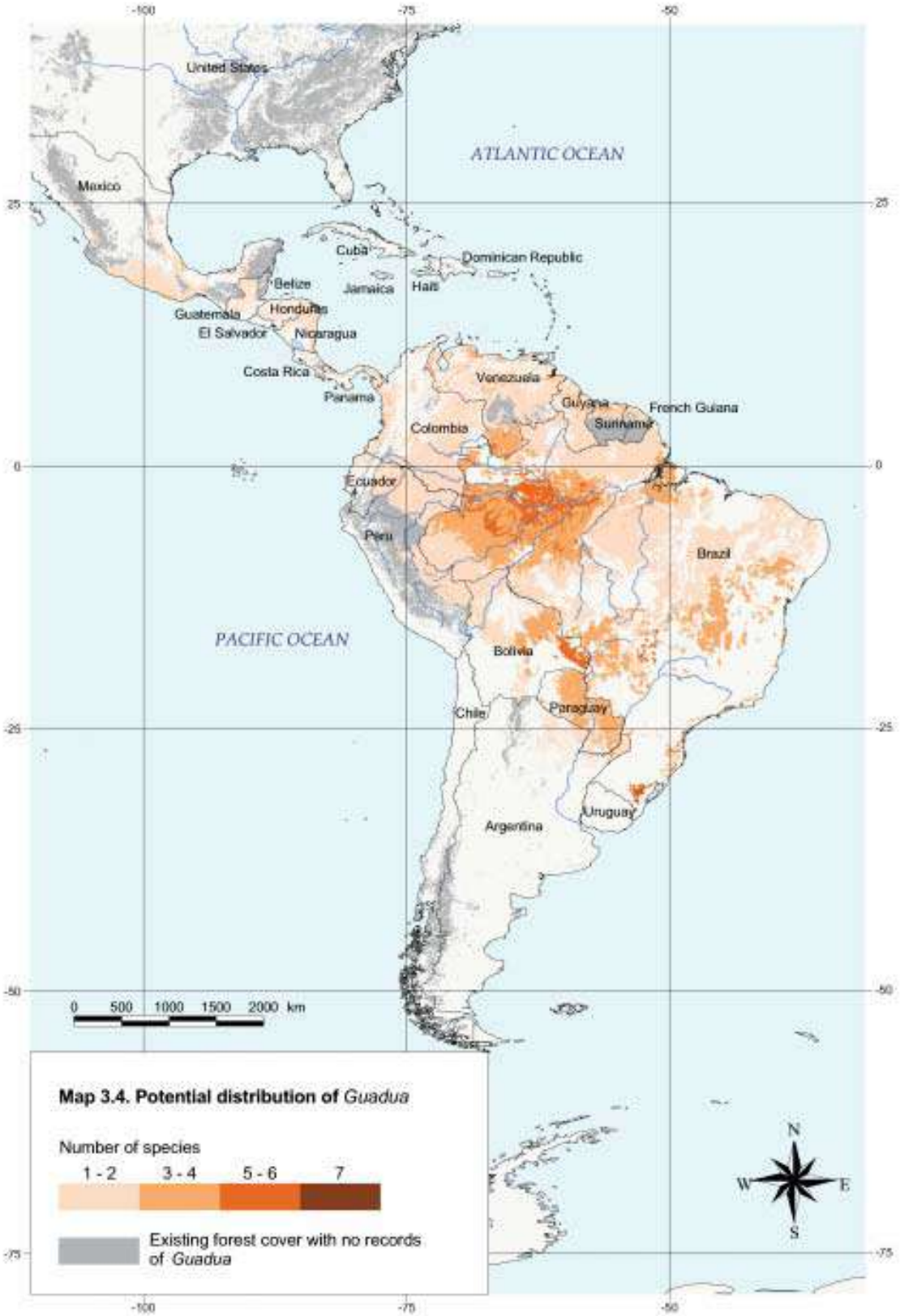



Figura 3. Mapa de la distribución potencial del genero *Guadua*.
Fuente: IMBAR. 2004. Bamboo diversity, Africa, Madagascar and the Americas.

La *G. angustifolia* se desarrolla muy bien entre los 0 y 1.600 metros, pero también crece en buenas condiciones hasta los 1.800 m., por encima de esta altura hasta los 2.000 m, los rendimientos son más bajos (Pérez, 1979). Figura 4

En Colombia la guadua se encuentra distribuida a lo largo de la Cordillera Central en los departamentos de Antioquia, Cauca, Caldas, Cundinamarca, Huila, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca. Se calcula que existen entre 50.000 y 60.000 ha. de guadua, de los cuales el 95% son naturales y el 5% cultivados; sólo son aprovechadas el 40% del total, es decir, aproximadamente 24.000 ha. Según algunas estimaciones en Antioquia, Huila, Putumayo, Caquetá, Cundinamarca, Cauca y Nariño se cuenta con importantes cubiertas boscosas de guadua, las cuales no disponen de registros de información. En el caso de Cundinamarca, se señala la presencia de 1.965 ha y en el Huila, se estima un área actual de 3.500 ha (Pérez, 2006).

En 1963 se reporta la espontánea aparición de la especie en Venezuela, Brasil, Paraguay y Argentina. También se habla sobre la existencia de informes que datan del siglo XVI en los cuales consta que en aquella época había grandes guaduales entre Panamá y Guayaquil (Hidalgo, 1974).

Figura 4. Mapa de distribución potencial de *Guadua angustifolia* Kunth.

Fuente: IMBAR. 2004. Bamboo diversity, Africa, Madagascar and the Americas.

En Colombia se ha registrado una diversidad de bambúes de aproximadamente 100 especies en 19 géneros, de las cuales 24 son endémicas. Estas especies se distribuyen desde el nivel del mar hasta los 4100 msnm (Judziewicz *et al.,* 1999; Londoño, 1990, 2004) y ocupan las cinco regiones geográficas en que está dividido el país.

La guadua 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 que repercute directamente en la pérdida de recursos genéticos que aún permanecen desconocidos y que puedan ser de gran importancia en programas de manejo y mejoramiento de esta especie con valor comercial.

El 100% de las reforestaciones con bambú se han hecho hasta el momento con *G. angustifolia*, existiendo actualmente en el Eje Cafetero aproximadamente 5.000 ha cultivadas y 28.000 ha naturales. Se ha seleccionado esta especie por sus características físico-mecánicas, por el porcentaje alto de fibra en su madera (40%), por su gran porte (30 m altura, 25 cm diámetro) y por su alta concentración de sílice que la hace más resistente a la humedad que otros materiales naturales (Londoño *et al.,* 2002; Gritsch *et al.,* 2004).

La dinámica al interior de la cadena de la guadua en los últimos 20 años, ha permitido generar productos con valor agregado para el mercado nacional e internacional. Sin embargo, se carece de programas de conservación genética y de selección de materiales superiores.

### 1.2.2. Genotipificación

Como apoyo a la selección y al mejoramiento genético se han desarrollado los marcadores moleculares o huellas de ADN. Esta tecnología se utiliza para la identificación de genotipos, para medir distancias genéticas entre individuos muy relacionados entre sí para conocer la variabilidad existente en una colección de germoplasma y para estudios de variabilidad genética en poblaciones naturales (Marulanda & López 2010).

Los datos moleculares pueden proporcionar información útil sobre diversos aspectos de taxonomía, a pesar de esto hay muy poca información disponible sobre la diversidad genética o la estructura poblacional del bambú. Las técnicas moleculares basadas en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), como la amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD), Secuencia entre repeticiones simples (ISSR), repeticiones de secuencia simple (SSR), polimorfismo de la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP), y polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), se han utilizado para estudios filogenéticos en bambú (Kochert 1994; Kobayashi, 1997; Barkley *et al.,* 2005; Friar & Kochert, 1991).

El estudio de Das *et al.* (2005) desarrolló dos secuencias de cada especie caracterizando regiones amplificadas (SCAR) para diferenciar las especies *Bambusa balcooa* y *B. tulda.* Los AFLP han demostrado ser útiles en diversos aspectos de sistemática de bambú, estructura poblacional y estudios de diversidad (Loh *et al.,* 2000; Marulanda *et al.,* 2002; Suyama *et al.,* 2000). El uso de marcadores SSR es limitada por la disponibilidad de microsatélites específicos para bambú, sin embargo, se han aplicado con éxito a *Phyllostachys* (Lai & Hsiao 1997) y *Bambusa* (Nayak & Rout 2005).

Marcadores polimórficos EST-SSR derivados de principales cultivos de cereales han sido recientemente utilizados para evaluar la diversidad genética y filogenética (Barkley *et al.,* 2005, Sharma *et al.,* 2008). El uso de marcadores ISSR en bambú se limita a cultivares de *Phyllostachys pubescens* (Lin *et al.,* 2009).

En Colombia se han hecho estudios de diversidad de bambúes (Londoño, 1990) y estudios con marcadores moleculares (Marulanda *et al.,* 2002; Potosí, 2005) de *G. angustifolia* pero no se han relacionado con características de calidad para los diferentes sectores de la cadena.

En el banco de germoplasma de Guadua en el Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá, no existe una colección de materiales superiores a la cual puedan tener acceso los miembros de la cadena.

En 1994 Zietkiewicz *et al.,* propusieron un método para medir la diversidad genética en plantas y animales usando cebadores basados en microsatélites. Esta técnica combina los beneficios de los microsatélites y los RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA). Hantula *et al.,* (1996) seleccionaron cuatro cebadores (GT, ACA, CCA, CGA) con una longitud de 18 bases que incluyen un extremo 5' "degenerado" de tres nucleótidos, el cual sirve de anclaje para asegurar la unión del cebador al inicio del microsatélite. Ellos denominaron a esta técnica RAM (Random Amplified Polymorphic DNA).

Los RAMs se basan en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), el método es altamente reproducible y permite la detección de polimorfismo en el ADN intra e interespecífico. Los fragmentos de ADN amplificados en la reacción están compuestos de dos microsatélites suficientemente cercanos para amplificar por PCR el área entre ellos (Zietkiewicz *et al.,* 1994).

La técnica RAMs se ha utilizado con éxito en vegetales como uchuva (*Physallis peruviana*,Bonilla *et al.*, 2004), mora (*Rubus s*p., Morillo *et al.*, 2003), guayaba (*Psidium guajava*) (Sanabria *et al.*, 2006), nacedero (*Tric*h*antera gigantea*, Posso 2010) y para la genotipificación de variedades de arroz (Palacio, 2006. Comunicación personal).

## 1.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 1.2.1. Área de estudio

El Eje Cafetero es una eco-región topográfica de Colombia, comprendida en su extensión por los departamentos de Caldas, Risaralda, Quindío, la región nor-oriental del departamento del Valle del Cauca y toda la región del suroeste de Antioquia. La precipitación media anual es de 2.750 mm, con dos grandes temporadas de lluvias (abril a junio y de agosto a noviembre), la temperatura media anual es de alrededor de 21 °C., Según la zona de vida propuesta por Holdridge *et al.,* (1971) el área de estudio pertenece a bosque húmedo tropical, bosque tropical muy húmedo, bosque seco tropical y bosque húmedo premontano.

El material se colecto en fincas del Eje Cafetero colombiano (Tabla 1), las que fueron seleccionadas por medio de encuestas y estudios previos realizados en la zona (Muñoz *et al.,* 2008), con el fin de ubicar materiales superiores basados en variables de crecimiento y variables de calidad como dureza, diámetro, rectitud, longitud, espesor de la pared, presencia de ramas laterales, densidad y estado fitosanitario, se determinaron 23 sitios a trabajar (Tabla 1).

Tabla 1. Sitios de muestreo en los departamentos del Eje Cafetero.

| SITIO | MUNICIPIO | DPTO | COORDENAS DE UBICACIÓN | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | LATITUD N | LONGITUD O | A.S.N.M |
| **A** | Montenegro | QUINDIO | 4° 51’ 83” | 75° 80´ 25” | 1252 |
| **C** | Montenegro | QUINDIO | 4º 33` 16,2" | 75º 48` 8,3" | 1250 |
| **D** | Montenegro | QUINDIO | 4º 55` 50" | 75º 80` 36" | 1247 |
| **E** | Montenegro | QUINDIO | 4º 33` 25,6" | 75º 48` 28,1" | 1223 |
| **G** | Montenegro | QUINDIO | 4º 33` 03,4" | 75º 48` 06,3" | 1239 |
| **H** | Circasia | QUINDIO | 4º 35` 50,5" | 75º 39` 34,4" | 1616 |
| **J** | Quimbaya | QUINDIO | 4º 35` 54,6" | 75º 48` 58,6" | 1164 |
| **K** | Quimbaya | QUINDIO | | | |
| **L** | Armenia | QUINDIO | 4º 31` 7,4" | 75º 46` 17,3" | 1190 |

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| **M** | Quimbaya | QUINDIO | 4º 36` 25,1" | 75 44` 77" | 1420 |
| **N** | Quimbaya | QUINDIO | | | |
| **Ñ** | Circasia | QUINDIO | 4º 35´49" | 75º 38´ 45" | 1683 |
| **O** | Pereira | RISARALDA | 4 º 47 ` 0,7" | 75º 47` 17,6 " | 1221 |
| **P** | Pereira | RISARALDA | 4º 50` 09,6" | 75º 49` 28,5" | 1140 |
| **T** | Córdoba | QUINDIO | 4º 24´ 07.33" | 75º 42´ 56.49" | 1176 |
| **U** | Marcella | RISARALDA | 4 º 58` 3,8" | 75 º 42` 55 " | 1153 |
| **V** | Marcella | RISARALDA | 4º 57 ` 7,8" | 75º 42` 4,9" | 1020 |
| **W** | Chinchina | CALDAS | 4º 58 ` 6,3" | 75º 39` 41,3" | 1318 |
| **X** | Manizales | CALDAS | 5 º 00` 1,5 " | 75º 33` 52,4" | 1776 |
| **Y** | Manizales | CALDAS | 5 º 00` 19,6" | 75º 35` 12" | 1308 |
| **Z** | Palestina | CALDAS | 5º 0,1` 22,3" | 75º 39 `25,5 " | 1318 |
| $\alpha$ | Pereira | RISARALDA | 4º 51´ 54,5" | 75º 45´ 08,9" | 1320 |
| $\gamma$ | Cartago | VALLE | | | |

### 1.2.2. Colecta de germoplasma

Para la genotipificación de los materiales de *G. angustifolia*, se tomaron muestras de hojas jóvenes que se encuentran en la parte final de las ramas, se colectaron entre 5 a 8 hojas, se etiquetaron con el número de sitio y colecta y se envolvieron en papel aluminio, luego fueron conservadas en nitrógeno líquido (Figura 5), hasta el momento de su procesamiento en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, en donde se realizaron todos los análisis de laboratorio y estadísticos de datos.

Figura 5. Colecta de material para extracción de ADN de guadua.

### 1.2.3. Genotipificación con marcadores moleculares

Para la genotipificación de los materiales *G. angustifolia* se utilizaron marcadores moleculares RAMs (microsatélites aleatorios).

#### 1.2.3.1. Extracción del ADN

Las muestras fueron maceradas utilizando morteros de porcelana y nitrógeno líquido para evitar la degradación del ADN y la producción de otros metabolitos que pudieran interferir con las pruebas moleculares (Figura 6). Una vez macerado el tejido vegetal, se almacenó en tubos plásticos cónicos de 15 ml. a -20 °C hasta el momento de su utilización. Para la extracción de ADN se evaluaron dos metodologías descritas por Dellaporta *et al.* (1983) con algunas modificaciones (Anexo A y B).

Figura 6. Extracción de ADN de guadua

### 1.2.3.2. Evaluación de cantidad y calidad de ADN

Para la evaluación de la calidad y cantidad del ADN obtenido se realizaron geles de agarosa al 0,8% corridos en tampón TBE 0.5X (Tris-borato 0045M; EDTA 0.001M) a 80 voltios durante 45 minutos. Estos fueron teñidos con bromuro de etidio a una concentración final de 0.5 ug/ml. Las concentraciones de ADN se determinaron mediante comparación con concentraciones conocidas de ADN del bacteriófago lambda (Figura 7). Se realizaron diluciones de todas las muestras extraídas a una concentración final de 10 ng/ul (Figura 8) en tubos nuevos, las cuales fueron utilizadas como ADN de trabajo para las reacciones de PCR

.

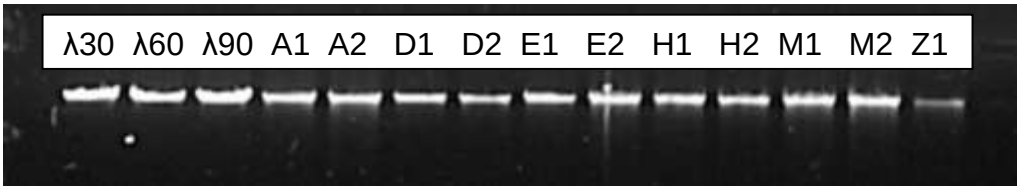



Figura 7. ADN total de guadua teñido con bromuro de etidio

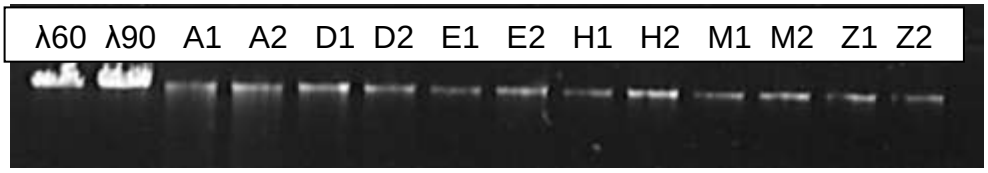



Figura 8. ADN diluido de guadua teñido con bromuro de etidio

### 1.2.3.3. Metodología para marcadores moleculares tipo RAMs

Se evaluaron siete cebadores para RAMs (Tabla 2) con las condiciones de amplificación por PCR descritas por Bonilla *et al.* (2008) para uchuva *Physallis peruviana* (Tabla 3).

Tabla 2. Cebadores RAMs. Las siguientes designaciones son usadas para los sitios degenerados: H (A ó T ó C); B (G ó T ó C); V (G ó A ó C) y D (G ó A ó T)

| **Cebador** | **Secuencia** |
|---|---|
| CT | DBDCTCTCTCTCTCTC |
| CGA | DHBCGACGACGACGACGA |
| CA | DBDACACACACACACACACA |
| AG | HBHAGAGAGAGAGAGAGAG |
| TG | HVHTGTGTGTGTGTGTGT |
| CCA | DDBCCACCACCACCA |
| GT | VHV GTG TGT GTG TG |

Tabla 3. Condiciones de amplificación para RAMs utilizados en la investigación

| REACTIVO | [ ] INICIAL | [ ] FINAL | VOLUMEN |
|---|---|---|---|
| **Buffer TAQ** | 10X | 1X | 2,5 µl |
| **dNTPs** | 1.25mM | 0.2mM | 4µl |
| **Cebador** | 50µm | 2µM | 1 µl |
| **MgCl2** | 50mM | 2.5mM | 1.25 µl |
| **ADN** | | 10 ng | 2 µl |
| **Taq polimerasa** | 5 U/µl | 0.625 U | 0.1 µl |
| **BSA (Albumina de suero bovina)** | 10mg/ml | | 1 µl |
| **Agua desionizada** | | | 13.15 µl |
| Volumen final | | | **25 µl** |

Las condiciones de hibridación se establecieron de acuerdo al cebador seleccionado (Tabla 4). Los productos amplificados se visualizaron en geles de poliacrilamida al 7% (37:1 acrilamida – bisacrilamida) corridos a 160 voltios por una hora y diez minutos y teñidos con bromuro de etidio y sales de plata como se describe en protocolos estándar (Sambrook *et al.,* 1989). Una vez teñidos, los geles fueron secados utilizando papel celofán para su conservación final y documentados mediante escaneo o fotografía digital.

Tabla 4. Perfil térmico de amplificación para RAMs utilizado en la investigación.

| CICLO | TEMPERATURA (ºC) | | | TIEMPO (Cebador) | | | Etapa |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | AG, CA | TG, CT, CCA | GT, CGA | AG, CA | TG, CT, CCA | GT, CGA | |
| 1 | | 95 | | | 5 min | | Desnaturalización Inicial |
| 2 | | 95 | | | 30 seg. | | Desnaturalización |
| 3 | 50 | 55 | 58 | | 45 seg. | | Hibridación |
| 4 | | 72 | | | 2 min | | Extensión |
| 5 | 37 ciclos desde el paso dos | | | | | | |
| 6 | | 72 | | | 7 min | | Extensión final |
| 7 | | 16 | | | 5 min | | Fin |

#### 1.2.3.3.1. Análisis de datos

La información de los patrones de bandas obtenidos se registró en una matriz binaria de presencia (1) o ausencia (0). 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 SIMQUAL del paquete NTSYS- pc

(*Numerical Taxonomy System for Personal Computer)* y el programa TFPGA (*Tools for Population Genetic Analisys*) se realizaron los análisis estadísticos.

Para el estudio del conjunto de individuos, se partirá de la definición de similaridad de Nei-Li (1979) (Leung *et al.,* 1993), también conocida como similaridad de DICE (1945) (Sneath & Sokal, 1973) o de Sorensen (1948) (citado por Henríquez, 2000) cuya fórmula es:

$$Sij = \frac{2a}{(2a + b + c)}$$

Donde:

Sij=Similaridad entre el individuo i y el j.

a=Número de bandas presentes simultáneamente en los individuos i y j.
b=Número de bandas presentes en i y ausentes en j.
c=Número de bandas presentes en j y ausentes en i.
El coeficiente de Dice omite la consideración de pares negativos (0-0) y da doble peso a los pares positivos (1-1), lo que lo hace útil en términos de similaridad del DNA, en la que la ausencia compartida de una banda no es necesariamente una indicación de similaridad entre dos individuos.

El análisis de agrupamiento se realizó con el programa SAHN de NTSYS –pc (versión 2.02, 1998) utilizando UPGMA, método gráfico de agrupamiento por parejas, que usa el promedio aritmético no ponderado. El dendrograma se construyó con el programa TREE de NTSYS –pc (versión 2.02, 1998). Se realizó un análisis de correspondencia múltiple (ACM) para asociar columnas y filas de la matriz binaria determinando el nivel de asociación o determinar proximidad (Joseph *et al.,* 1992). Para estimar la diversidad genética se utilizaron los parámetros de heterocigosidad promedio esperada (He) y el porcentaje de loci polimórficos (P), los cuales se estimarán sobre todos los loci y el promedio de los mismos de acuerdo con la fórmula no sesgada de Nei (1973), así:

**H= 1-Σf (i)2**
f(i): Frecuencia del alelo i en la población.

Se realizó un análisis de varianza molecular utilizando el programa GenAlex versión 6.2 (Peakall & Smouse, 2006) para evaluar la relación entre los sitios geográficos de procedencia de las muestras. Para ello se asumió que las muestras colectadas en cada sitio corresponden a una población diferente.

### 1.2.3.4. Genotipificación de materiales superiores

Por medio del proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, se realizó una selección de nueve (9) materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth, cinco para construcción, dos para preindustrialización y dos para muebles y artesanías.

Por medio de la selección de materiales superiores por caracteres morfométricos se obtuvieron seis de los materiales (Tabla 5), teniendo en cuenta diámetro, longitud comercial del culmo, espesor de la pared, volumen de madera, homogeneidad del cilindro y presencia de lumen. Se corrió el programa estadístico SAS y se escogieron las variables significativamente diferentes; Los otros tres materiales se seleccionaron por pruebas físico-mecánicas de laboratorio (Tabla 4), en el Laboratorio del Instituto de Investigaciones Tecnológicas de la Universidad Nacional sede Bogotá se realizaron los ensayos de compresión paralela a la fibra, módulo de elasticidad, corte paralelo a la fibra y contenido de humedad a las muestras o probetas enviadas de los diferentes sitios muestreados en la región del Eje Cafetero.

Tabla 5. Materiales superiores de *G. angustifolia* seleccionados.

| **Materiales seleccionados por caracteres morfométricos** | | | **Materiales seleccionados por pruebas físico-mecánicas de laboratorio** | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Construcción | D | H | C | W | ALFA |
| Preindustrialización | A | Z | | | |
| Muebles y artesanías | E | M | | | |

Con estos nueve materiales seleccionados se realizó la genotipificación por medio de marcadores moleculares RAMs, siguiendo la metodología antes descrita.

## 1.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1.3.1. Distribución de los sitios de colecta

Para la creación del mapa de los sitios de colecta de *Guadua angustifolia* Kunth se utilizó el software especializado en SIG (ArcGIS 9.3.1) de la Universidad Nacional de Colombia. Para la creación de estos mapas se usaron archivos de los límites municipales y departamentales en formato *shapefile* del SIGOT del Instituto Agustín Codazzi.

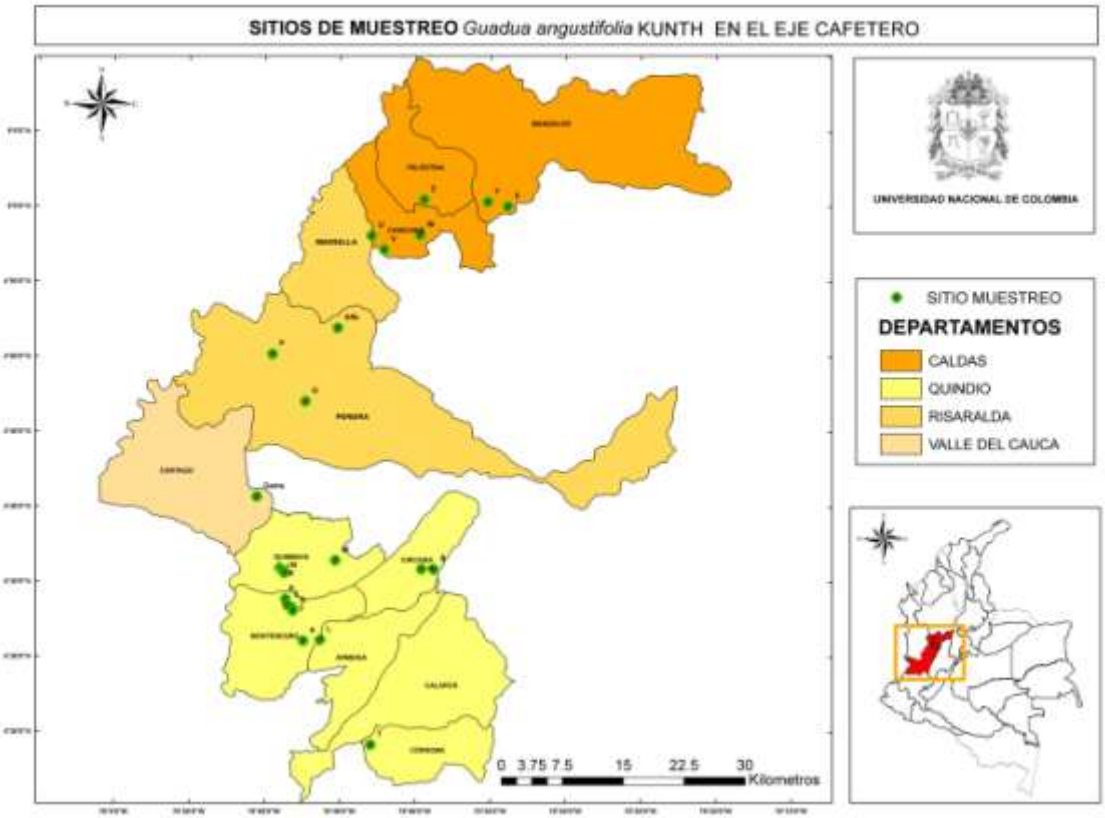



Figura 9. Mapa de distribución de los sitios de colecta de germoplasma de guadua en la eco-región Cafetera.
Fuente: datos de SIGOT elaborado por la Ing. Adriana Martínez Arias

### 1.3.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983), Se desarrollaron dos tipos de extracción, la primera con el protocolo sin ninguna modificación (Figura 10) y la segunda con algunas modificaciones a la metodología consistentes en la realización de una precipitación con fenol cloroformo alcohol isoamílico en proporción

24:24:1 y la dilución final del ADN en 100 ul de tampón TE 1X para asegurar una buena concentración y la eliminación de otras sustancias que pudieran interferir en las amplificaciones (Figura 11, Anexo B)

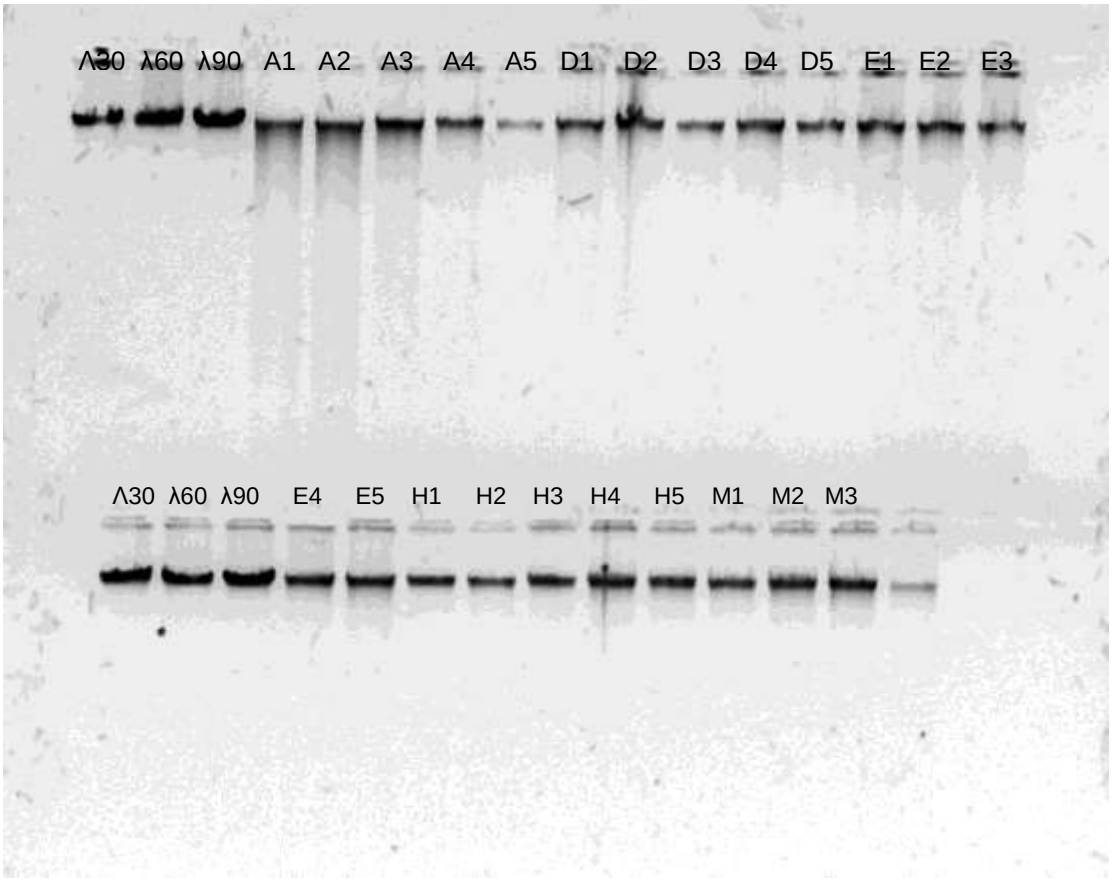



Figura 10. ADN total de guadua extraído con el protocolo Dellaporta *et al.* (1983)

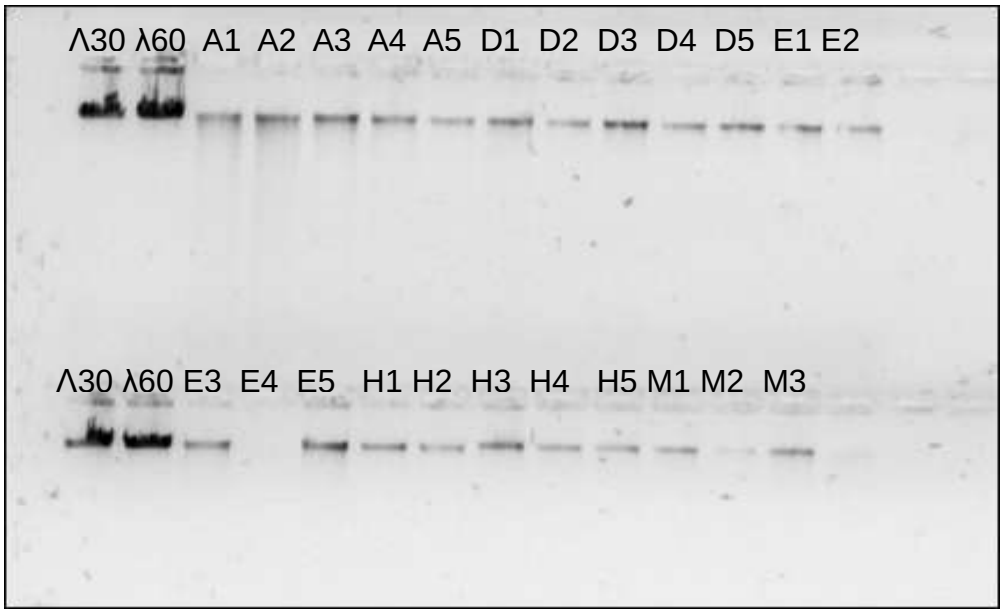



Figura 11. ADN de guadua extraído con el protocolo Dellaporta *et al.* (1983) purificado con fenol – cloroformo

El material extraído con el protocolo de Dellaporta *et al.* (1983) sin ser purificado daba unas concentraciones entre 50 y 300 ng/µl, mientras con la purificación con fenol – cloroformo las concentraciones estaban entre 10 y 20 ng/µl, ambos de muy buena calidad para la amplificación de la PCR.

### 1.3.3. Genotipificación por marcadores moleculares RAMs

Se utilizaron cinco de los siete cebadores RAMs por presentar algún grado de polimorfismo en 69 individuos de guadua. El cebador GT no amplificó en ninguna muestra y el cebador TG no amplificó para la mayoría de las muestras. Los cinco cebadores utilizados generaron un patrón de 113 bandas con pesos moleculares entre 1400 y 200 pb y el número de bandas por cebador estuvo entre 14 para CA y 27 para CCA (Tabla 6).

Tabla 6. Características del cebador, número de bandas por cebador, heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos para los 69 individuos de guadua evaluados.

| **Cebador** | **SECUENCIA (5' A 3')** | **Bandas totales** | **Bandas polimorficas** | **Rango pb.** | **He** | **Porcentaje de loci polimorficos** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| AG | HBHAGAGAGAGAGAGAGAG | 26 | 25 | 200 – 1300 | 0,3524 | 88,46 |
| CT | DBDCTCTCTCTCTCTCTC | 25 | 25 | 200 – 1400 | 0,3532 | 96,00 |
| CCA | DDBCCACCACCACCA | 27 | 25 | 200 – 1400 | 0,2942 | 81,48 |
| CGA | DHBCGACGACGACGACGA | 21 | 15 | 200 – 1300 | **0,2419** | **61,90** |
| CA | DBDACACACACACACACACA | 14 | 13 | 300 – 1300 | **0,4343** | **100,00** |
| **Total** | | **113** | **103** | | 0,3288 | 84,95 |

En trabajos realizados sobre diversidad genética en bambúes, Mukherjee, *et al. (*2010) realizaron un estudio de las relaciones genéticas entre 22 taxones de bambú por técnica ISSR y cebadores aleatorios EST-Based y obtuvieron 216 bandas totales, de las cuales cinco fueron monomórficas y 211 polimórficas. Marulanda & López (2010) caracterizaron 55 accesiones de *Guadua* spp. Mediante el empleo de marcadores moleculares AFLP, en este estudio se identificaron 771 bandas, de las cuales 382 fueron polimórficas. Potosí (2005) realizó la estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en guadua en el departamento del Cauca, Colombia, y encontró que cuatro de los 40 cebadores evaluados para RAPD's, amplificaron en todos los individuos analizados, presentando el mayor polimorfismo, al obtener 42 loci totales, de los cuales 40 fueron polimórficos.

En trabajos realizados en diversidad biológica utilizando la técnica RAMs en vegetales como uchuva se obtuvo un patrón de 50 bandas con siete cebadores para la evaluación de la diversidad genética de 43 accesiones del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira (Bonilla *et a.,* 2008). En mora, se obtuvo un patrón de 58 bandas al utilizar seis cebadores RAMs en la evaluación de la diversidad genética de 38 accesiones (Morillo *et al.*, 2005). En guayaba se obtuvieron 72 bandas con cinco cebadores RAMs para la evaluación de la diversidad genética de árboles nativos (Sanabria *et al.,* 2006). En la evaluación de la diversidad genética de la accesiones de nacedero (Posso, 2010) se seleccionaron cinco de los siete cebadores RAMs y se obtuvieron 71 bandas totales, de las cuales 59 fueron polimórficas.

Al comparar el número de loci RAMs generado por esos estudios y el obtenido por el presente encontramos que 113 bandas es un número adecuado para estimar parámetros genéticos y para evaluar la diversidad genética de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero.

Para obtener los valores de heterocigosidad esperada y % de loci polimórficos se utilizó el programa TFPGA.

La heterocigosidad esperada estima la probabilidad de que dos alelos extraídos al azar del conjunto de genes de una población sean diferentes. Como podemos observar, el valor de heterocigosidad para la población total fue de 0,328, lo que nos indica una alta diversidad de alelos en toda la población. En la Tabla 6 podemos observar que el valor más alto fue para CA (0,43) y el más bajo CGA (0,24). En cuanto al porcentaje de loci polimórficos, el cebador con más alto valor es el CA (100,00) y el de menos valor es el CGA (61,9).

Posiblemente el alto valor de He y polimorfismo presentado en el cebador CA, se deba a una mayor frecuencia entre los sitios de hibridación y las cadenas de ADN complementarias de esa secuencia.

El alto valor de polimorfismo (100% y 96%) y de He (0,43 y 0,35) encontrados con los cebadores CA y CT permiten deducir que estos cebadores fueron los que más aportan a la diversidad y resultan apropiados para su utilización en futuras investigaciones sobre la evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional de *G. angustifolia*. Sin embargo, los cebadores AG y CCA mostraron valores importantes de polimorfismo 88.4 % y 81.4 % y He 0,35 y 0,29 respectivamente. El cebador CGA mostró la He y polimorfismo más bajo (0,24 y 61.9%) por lo cual se lo considera el cebador con menos aporte a la diversidad (Figura 12). De manera general hubo correlación entre He y polimorfismo en los cebadores evaluados.

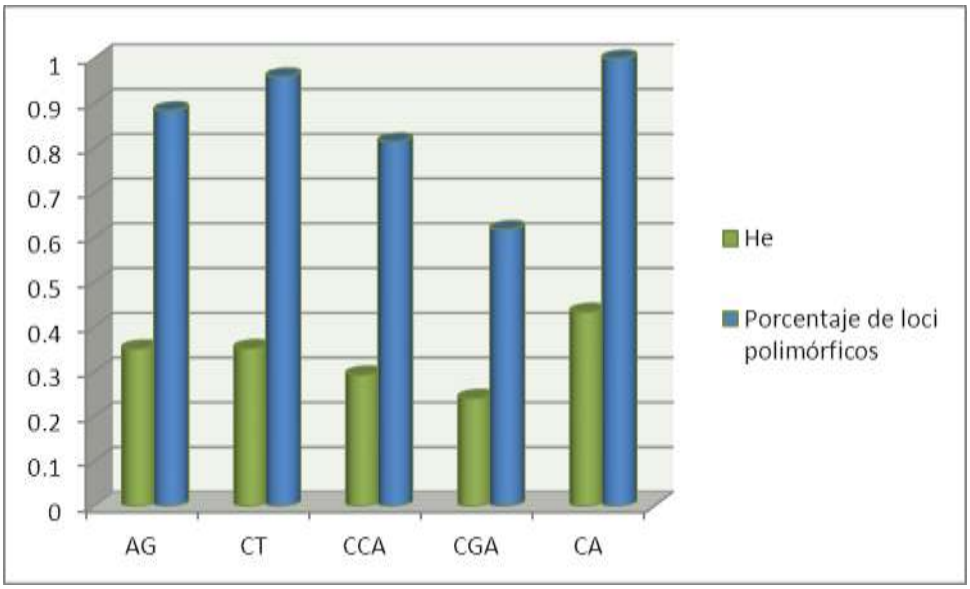


Figura 12. Heterocigosidad esperada (He) y Porcentaje de loci polimórficos.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por la prueba Exacta (Raymond and Rusell, 1995) elaborada por medio el programa TFPGA (Anexo C), la que no mostro diferencias significativas entre toda la población, se realizaron cuatro agrupaciones para la evaluación de la diversidad genética de acuerdo a la cercanía geográfica (Figura 13).

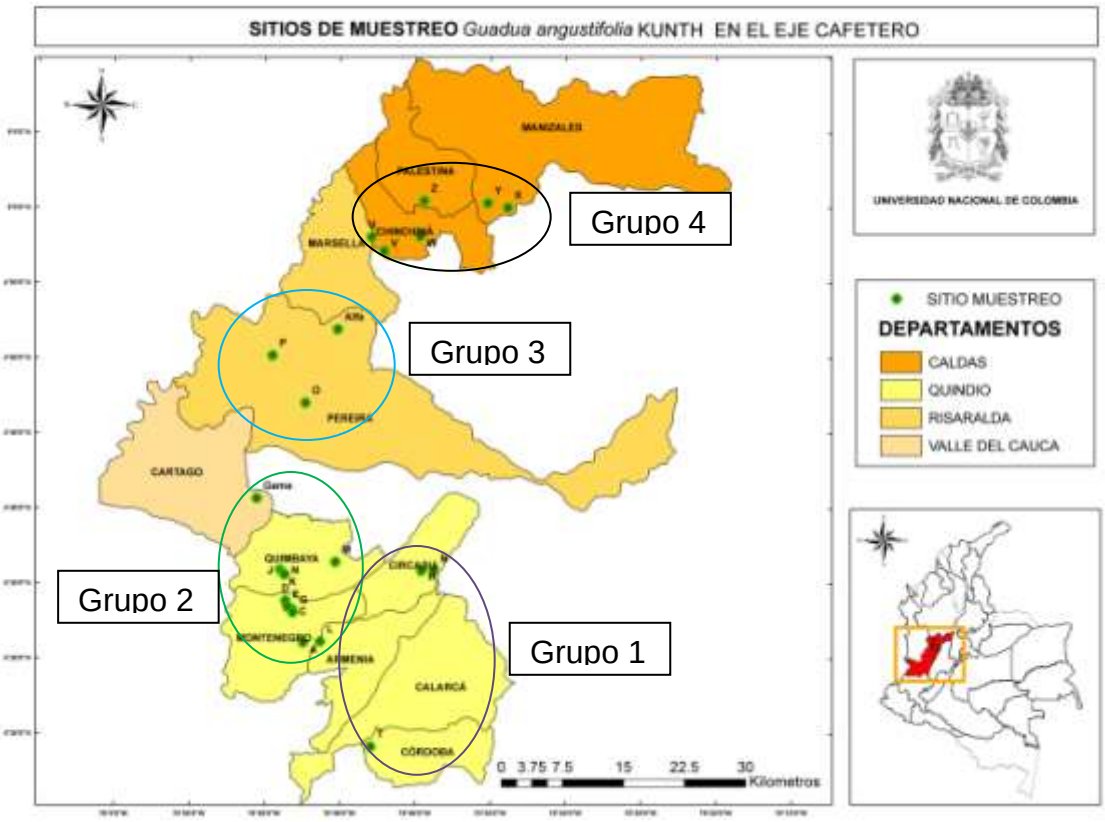



Figura 13. Mapa con las agrupaciones para estudio de diversidad genética de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero.

Tabla 7. Agrupaciones para análisis de diversidad genética de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero.

| GRUPO | SITIOS | Departamentos |
|---|---|---|
| **1** | H, T, Ñ | Quindío |
| **2** | A, C, D, E, G, J, K, L ,M, N, GAMA | Quindío y Norte del Valle del Cauca |
| **3** | O, P, ALFA | Risaralda |
| **4** | U, V, W, X, Y, Z | Caldas |

A partir estas cuatro agrupaciones (Tabla 8), se evaluó nuevamente la heterocigosidad esperada y el porcentaje de loci polimórficos.

La heterocigosidad esperada es también denominada diversidad genética, aunque esta denominación no es aconsejable ya que puede confundirse con variación genética "en general" y no solo al valor de He (Caujapé, 2006). El valor encontrado para las muestras de *G. angustifolia* colectadas en el Eje Cafetero es alto ya que se ha estimado que 0 ≤ He ≤ 0,3 y no parece haber ningún organismo bisexual con valores superiores de He=0,31 (Nei 1975; Selander 1979; citado por Caujapé 2006).

Aunque no existen estudios de diversidad genética usando marcadores moleculares RAMs en guadua para realizar comparaciones, en el trabajo realizado por Marulanda & López (2010) sobre la variabilidad genética utilizando marcadores moleculares AFLP obtuvieron una heterogeneidad promedio de 0.89091 valor muy alto por encima de los rangos reportados en otros estudios, Sin embargo, en otro estudio realizado con marcadores moleculares RAPD en guadua del departamento del Cauca (Potosí, 2005) el valor reportado por el índice de diversidad de Shannon es de 0,445 +/- 0,195, indicando un valor de diversidad genética alta. En otras investigaciones usando marcadores moleculares RAMs en otros vegetales se encontraron valores de He altos como en un estudio con árboles nativos de guayaba del Valle del Cauca reportó una He de 0,44 (Sanabria *et al.,* 2006). En accesiones de mora *Rubus* sp (Morillo *et al.,* 2005) valores de He de 0,31 y uchuva *Physallis peruviana* (Bonilla *et al.,* 2008) del banco de germoplasma de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, un valor de He de 0,26 valores altos comparados con resultados obtenidos en cultivares comerciales de tomate *Lycopersicon sculentum,* en donde la He fue de 0,18 (Restrepo, 2003).

El valor más alto de He fue el del grupo dos (0,32), seguido del uno (0,28) y cuatro (0,27) y el valor más bajo fue el del grupo tres (0,17) (Tabla 9). Estos resultados nos indican que los grupos dos y uno conformados por individuos de los departamentos del Quindío y Caldas presentaron los valores de mayor diversidad genética, esto posiblemente porque en el grupo dos se muestreo en una hacienda donde el área total del guadual es de 120 ha y corresponde a un bosque natural, además en estos dos grupos se tiene el mayor número de sitios muestreados, en el grupo tres con muestras provenientes del departamento de Risaralda se obtuvo el valor más bajo de heterocigosidad, esto se puede explicar porque uno de los sitios muestreado fue un guadual plantado por rizomas, donde no hay flujo genético sino reproducción vegetativa.

Tabla 8. He y porcentaje de loci polimórficos para los cuatro grupos formados de *G. angustifolia* en el Eje Cafetero.

| Grupo | Heterocigosidad esperada | % Loci polimórficos |
|---|---|---|
| **1** | 0.2894 | 61.0619 |
| **2** | **0.3176** | **76.9911** |
| **3** | **0.1777** | **42.4779** |
| **4** | 0.2784 | 74.3363 |

#### 1.3.3.1. Coeficiente de diferenciación genética (Fst)

El Fst cuantifica la consanguinidad de las subpoblaciones 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).

Estudios de diversidad genética en colecciones y bancos de germoplasma de guayaba (Rueda *et al.,* 2006), cacao (Moreno *et al.*, 2004) y uchuva (Bonilla *et al.*, 2008), no reportan datos estadísticos de estructura poblacional por considerar que las accesiones de los bancos no corresponden a una muestra representativa de poblaciones naturales y en muchas ocasiones, una región geográfica se encuentra representada por solo una o dos accesiones.

A partir de las cuatro agrupaciones se realizó una estimación del índice de fijación (Fst) para verificar la existencia de diferenciación genética entre las muestras de guadua de acuerdo a cada uno de los grupos formados. El valor de Fst encontrado en este estudio fue de 0.1771 (D.S= 0,0163; 1000 replicaciones) lo que indica que existe una alta diferenciación genética de los grupos (Tabla 9). En el estudio realizado por Marulanda & López (2010) obtuvieron un valor de Dst de 0.0909 valor bajo de diferenciación genética, mientras que en el estudio realizado por Potosí (2005) el Gst (índice de estructura genética) fue de 0.5200 mostrando muy alta diferenciación genética.

Tabla 9. Clasificación de la diferenciación genética de acuerdo al Fst propuesta por Wright (1978)

| Valores de Fst | Grado de diferenciación | Valor Fst de este estudio |
|---|---|---|
| **0 - 0.05** | Poca diferenciación genética | |
| **0.06 - 0.15** | Moderada diferenciación genética | |
| **0.16 – 0.25** | Alta diferenciación genética | 0.1771 |
| **Mayor de 0.25** | Gran diferenciación genética | |

El valor de Fst obtenido en este estudio confirma la alta diversidad genética existente en los guaduales muestreados en el Eje Cafetero, y que a pesar que la mayoría de estos se reproducen vegetativamente, el flujo genético es dado principalmente por la producción masiva de semillas (máximo dos veces en el año), las que pueden ser transportadas por corrientes de agua o por dispersión de aves, ya que se ha reportado una especie de loro

especializada en consumir esta semilla (Londoño, comunicación personal). En el documento escrito por Muñoz (2011), se tiene datos que a partir de 13811 flósculos (unidad floral de la guadua) colectados en diciembre 13 y 22 de 2009, en 15 sitios, se obtuvieron 567 semillas para  4.11 semillas obtenidas por cada 100 flósculos, lo que corrobora la producción masiva de semillas.

#### 1.3.3.2. Análisis descriptivo

Para el análisis descriptivo se realizó un dendrograma con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978). Mediante el método de clasificación UPGMA (Figura 14), se mostró que no existe una relación significativa entre los grupos geográficos. A un nivel aproximado de similitud de 0,75 se formaron siete grupos (A, B, C, D, E, F y G).

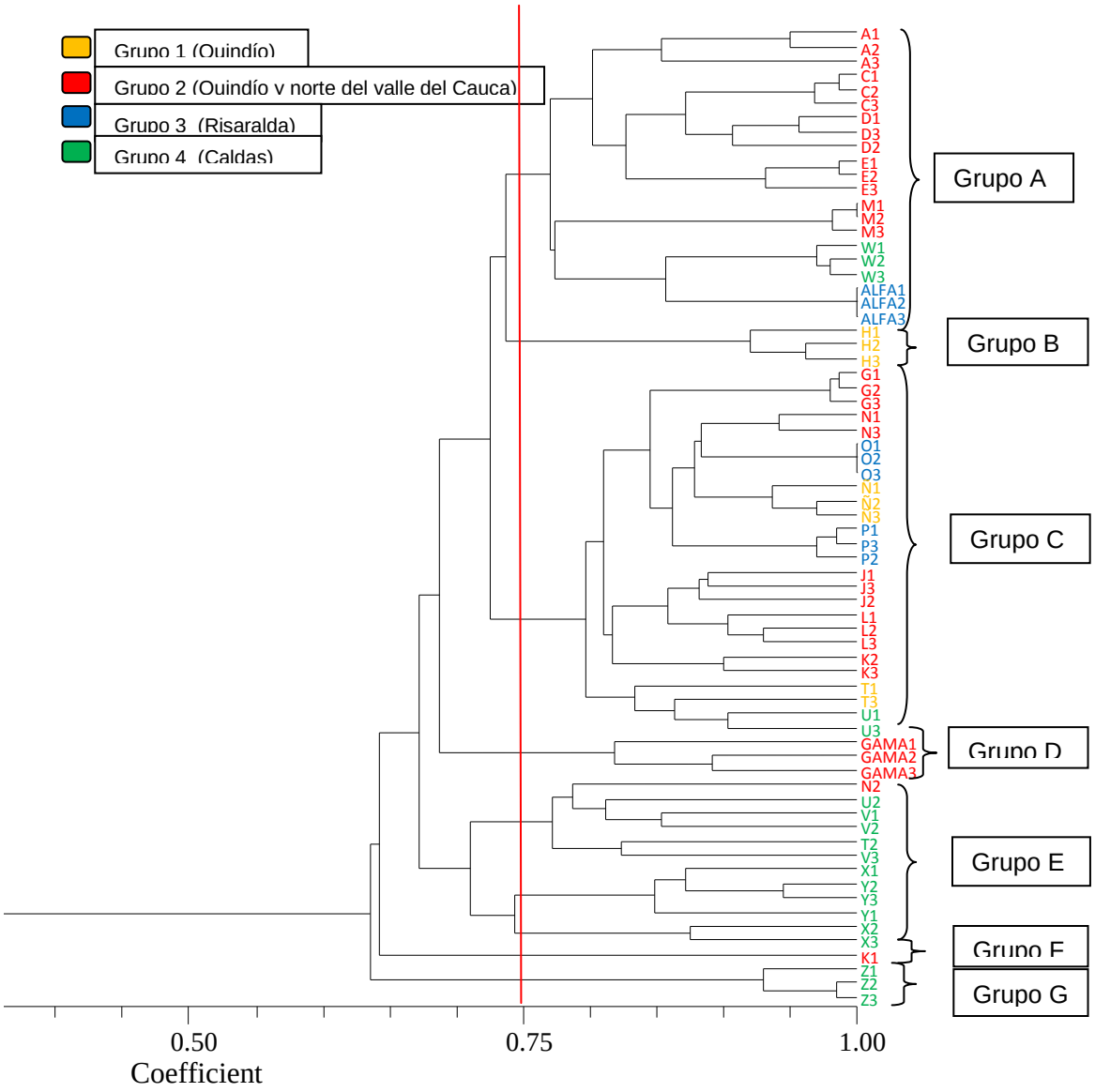



Figura 14. Dendrograma obtenido con el coeficiente de similitud de Dice.

En el grupo A se observa la mayoría de los individuos del Quindío, el sitio W de Caldas y Alfa de Risaralda, el cual mostro individuos genéticamente idénticos, probablemente por ser de origen vegetativo. El grupo B, formado por los individuos del sitio H, cuya procedencia es el municipio de Circasia en Quindío, es el que tiene mayor elevación altitudinal (1616 m.); en el grupo C también se observan individuos de todos los departamentos evaluados, los individuos del sitio O genéticamente idéntico lo que indica un posible origen vegetativo. El grupo D, formado por los individuos del sitio Gama procedentes de Cartago Valle del Cauca, en el grupo E están la mayoría de los individuos del departamento de Caldas; en el grupo F se observa un solo individuo del sitio K de Quimbaya, lo que indica que su procedencia puede ser similar a las muestras de Caldas que a las del Quindío; el grupo G está representado por las muestras del sitio Z de Palestina Caldas, que presentó un porcentaje de similitud del 64% con los demás grupos.

En general se formaron agrupaciones de acuerdo al lugar geográfico de procedencia, los individuos que quedaron separados de estos grupos nos muestran un posible flujo genético, intercambio de rizomas o dispersión de semillas, con excepción de los individuos procedentes de Risaralda, donde se encuentran los sitios Alfa y O que tienen una similitud de 100%, lo que tal vez se puede explicar con una reproducción netamente vegetativa o por no ser guaduales de origen natural.

### 1.3.3.3. Distancia genética

La mayor distancia genética fue para los grupos 3 y 4 (0,119), resultado que puede explicarse por el origen de cada uno de los guaduales que forman este grupo procedentes de los departamentos de Risaralda y Caldas y la más baja para los grupos 1 y 2 (0,032), lo que puede ser explicado por la cercanía geográfica entre los sitios de muestreo de los dos grupos (Departamento de Quindío), que facilita el intercambio o flujo genético entre departamentos.

Tabla 10. Distancias genéticas entre las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua.

| Grupo | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|
| **1** | ******* | | | |
| **2** | 0.0324 | ******* | | |
| **3** | 0.0968 | 0.0860 | ******* | |
| **4** | 0.0480 | 0.0415 | 0.1195 | ******* |

El dendrograma para los cuatro grupos construido mediante el método UPGMA (Figura 16) y con un *bootstrapp* de 1000 repeticiones mostró un alto porcentaje de loci que soporta la formación de los nodos (Tabla 11) lo que indica una alta confiabilidad de los loci utilizados en el análisis de diversidad genética de la Guadua en el Eje Cafetero y la efectividad de la técnica molecular RAMs para el estudio realizado.

Este dendrograma muestra una cercanía entre los grupos 1, 2 y 4, mientras que el grupo 3 es el más lejano, lo que posiblemente se puede explicar por diferentes orígenes de los guaduales (Figura 15).

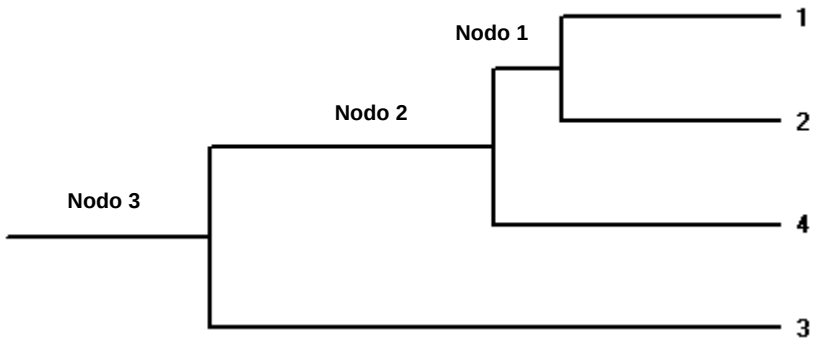


Figura 15. Dendrograma de las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua.

Tabla 11. Información de los loci que soportan la construcción del dendrograma de distancias de las cuatro agrupaciones de los sitios de muestreo de guadua.

| Nodo | Proporción de réplicas similares (1000 repeticiones) % | No. de loci que soportan el nodo | % total de loci que soportan el nodo |
|---|---|---|---|
| **1** | 72 | 29 | 25.66 |
| **2** | 100 | 28 | 24.78 |
| **3** | 100 | 113 | 100 |

### 1.3.3.4. Análisis de varianza molecular

Este método se usó para verificar si existe diferenciación de las poblaciones de acuerdo a los sitios geográficos donde fueron colectadas. Se asumió que cada uno de los cuatro grupos correspondía a una población separada. El análisis de varianza molecular para los cuatro grupos (Tabla 12) muestra que existe una variación entre los individuos de cada grupo (86%) (Figura 16). Esta alta variación podría indicar la existencia de subpoblaciones dentro de cada grupo de diferentes procedencias, tanto geográficas como por reproducción sexual. El 14% restante se debe al componente de varianza genética entre grupos, la cual no fue significativa (P> 0.010), indicando que no existe una diferenciación genética entre los cuatro grupos de guadua evaluados.

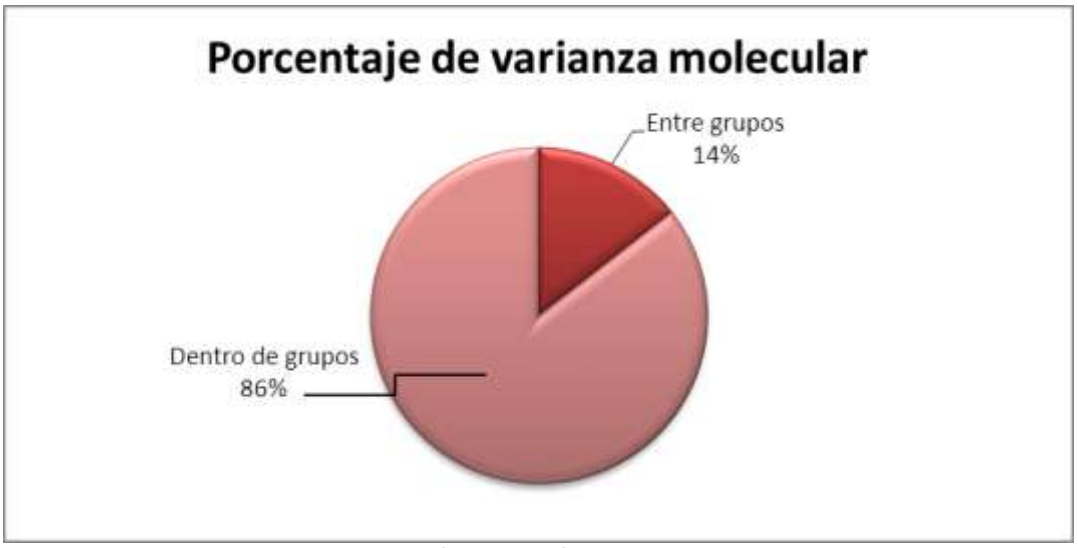


Figura 16. Porcentajes de variación del análisis de varianza molecular para los cuatro grupos de Guadua.

Tabla 12. Análisis de varianza molecular para los cuatro grupos formados.

| Fuente de Variación | GL | SC | MS | Porcentaje |
|---|---|---|---|---|
| Entre Grupos | 3 | 197.885 | 65.962 | 14 |
| Dentro de grupos | 65 | 1158.622 | 17.825 | 86 |
| **Total** | **68** | **1356.507** | | **100** |

### 1.3.3.5. Genotipificación de materiales superiores

A partir de la selección de los nueve (9) materiales superiores de guadua, realizada por el proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia”, se realizaron nuevas colectas del material vegetal en cada uno de los sitios (Figura 17).

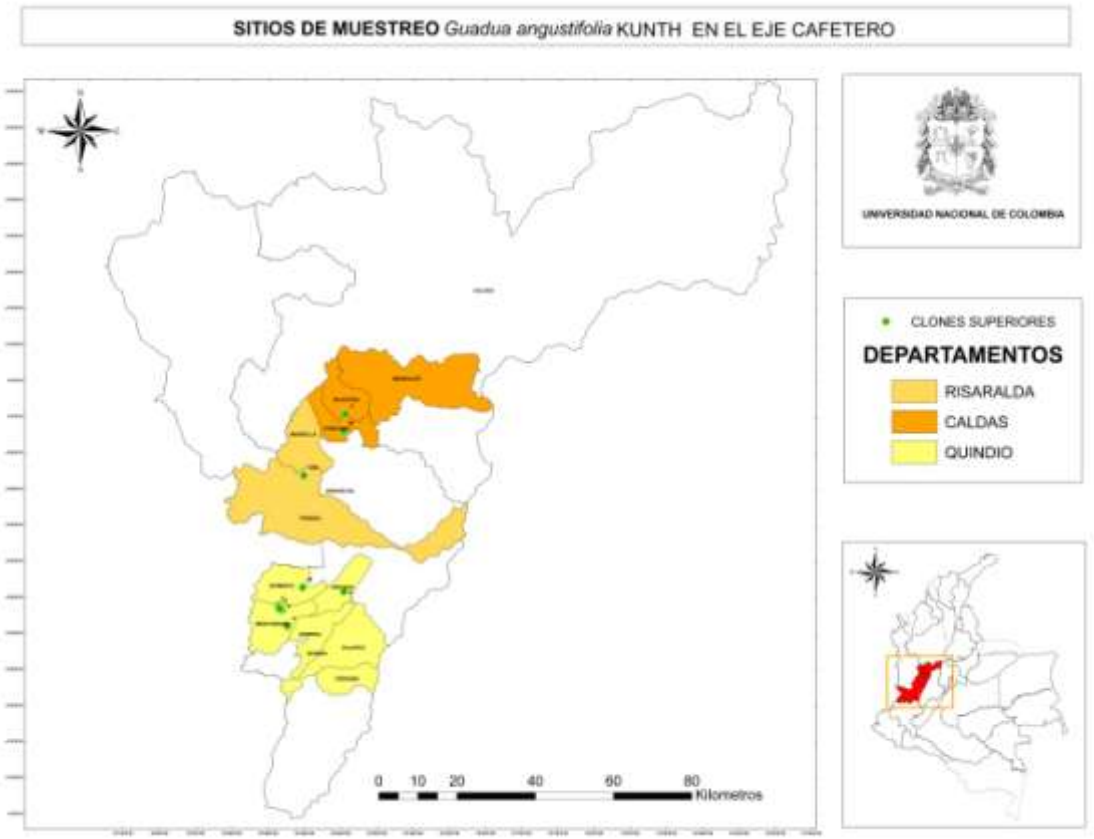



Figura 17. Mapa de los nueve materiales superiores de *G. angustifolia*.

La extracción de ADN se realizó siguiendo la metodología propuesta por Dellaporta *et al.* (1983), se obteniendo ADN de buena calidad y cantidad.

#### 1.3.3.5.1. Marcadores moleculares RAMs

Se utilizaron seis de los siete cebadores RAMs por presentar algún grado de polimorfismo. El cebador GT no amplificó en ninguna muestra. Los seis cebadores utilizados generaron un patrón de 116 bandas (anexo D) con pesos moleculares entre 1400 y 200 pb. El número de bandas por cebador estuvo entre 16 para AG y 24 para CT (Tabla 13).

Tabla 13. Número de bandas de los materiales superiores obtenidas con los 6 cebadores RAMs.

| CEBADOR | Nº BANDAS TOTALES | Nº BANDAS POLIMORFICAS |
|---|---|---|
| AG | 16 | 13 |
| CT | 24 | 12 |
| CCA | 22 | 20 |
| CGA | 20 | 20 |
| CA | 17 | 17 |
| TG | 17 | 17 |
| **Total** | **116** | **99** |

En los geles de poliacrilamida de cada uno de los cebadores teñidos con bromuro de etidio, se observaron diferencias en el número y cantidad de bandas polimórficas aun dentro de cada sitio (Figuras 19, 20, 21, 22, 23 y 24).

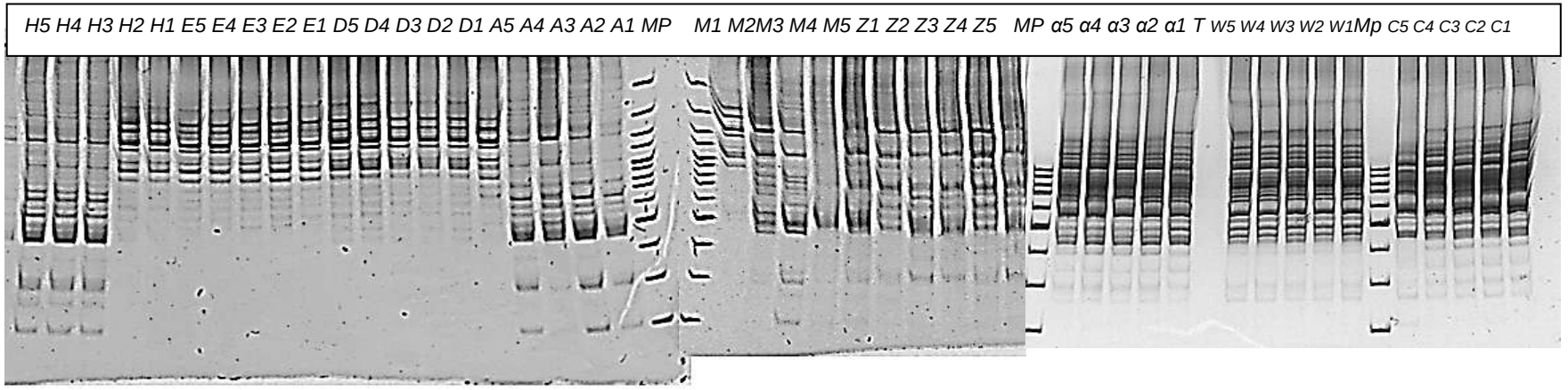



Figura 18. Gel de poliacrilamida Cebador TG, con tinción con bromuro

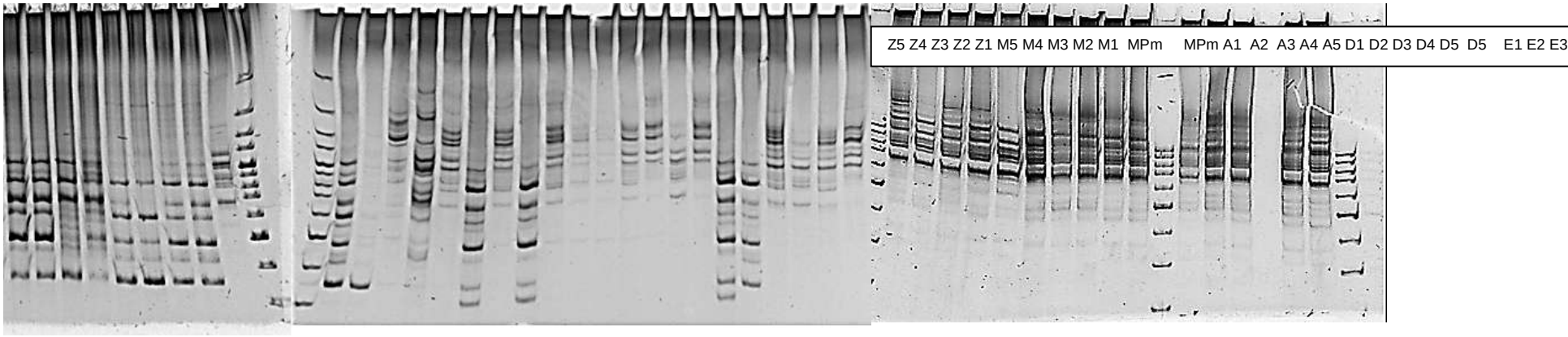



Figura 19. Gel de poliacrilamida Cebador CA, con tinción con bromuro

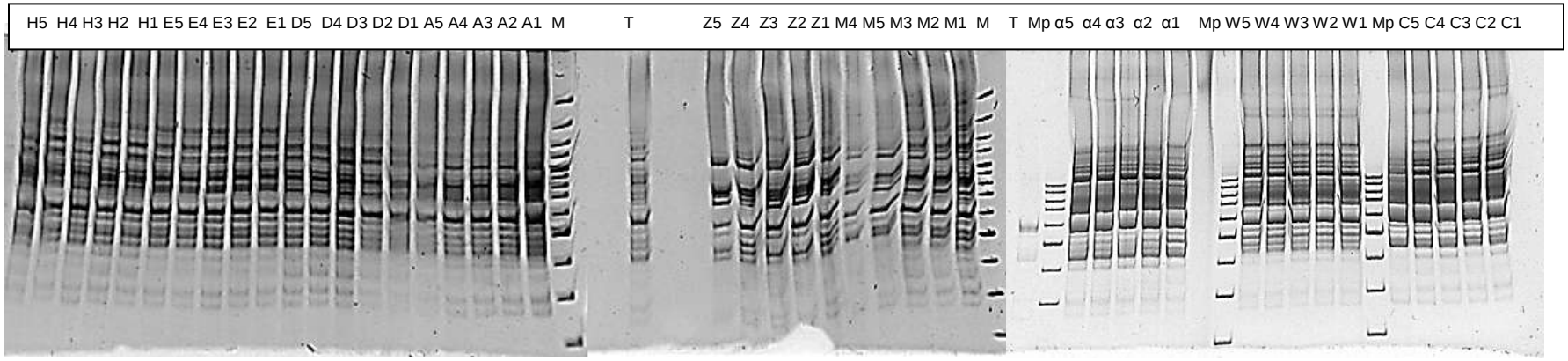



Figura 20. Gel de poliacrilamida Cebador CT, con tinción con bromuro

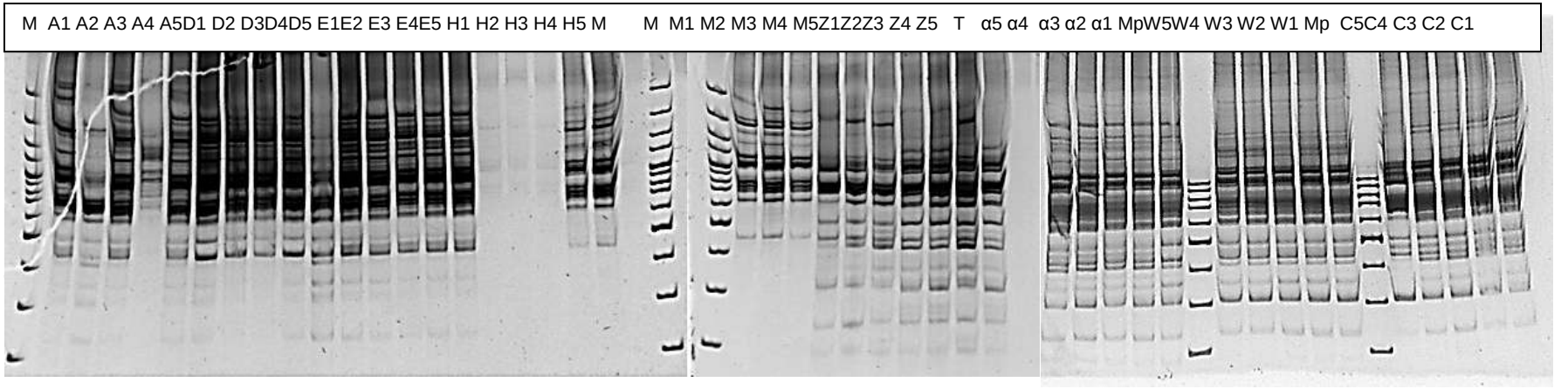



Figura 21. Gel de poliacrilamida Cebador CCA, con tinción con bromuro

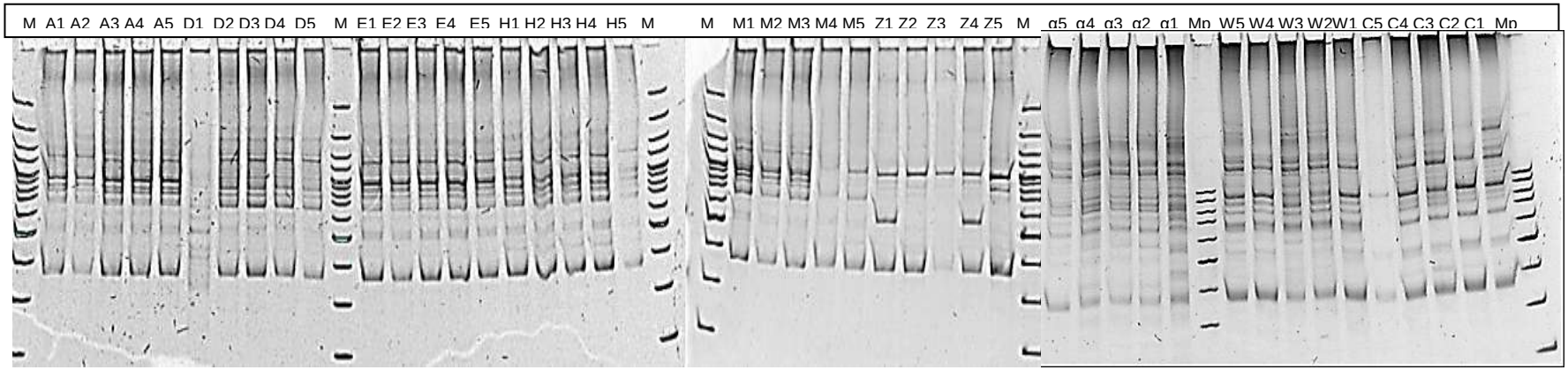



Figura 22. Gel de poliacrilamida Cebador TG, con tinción con bromuro

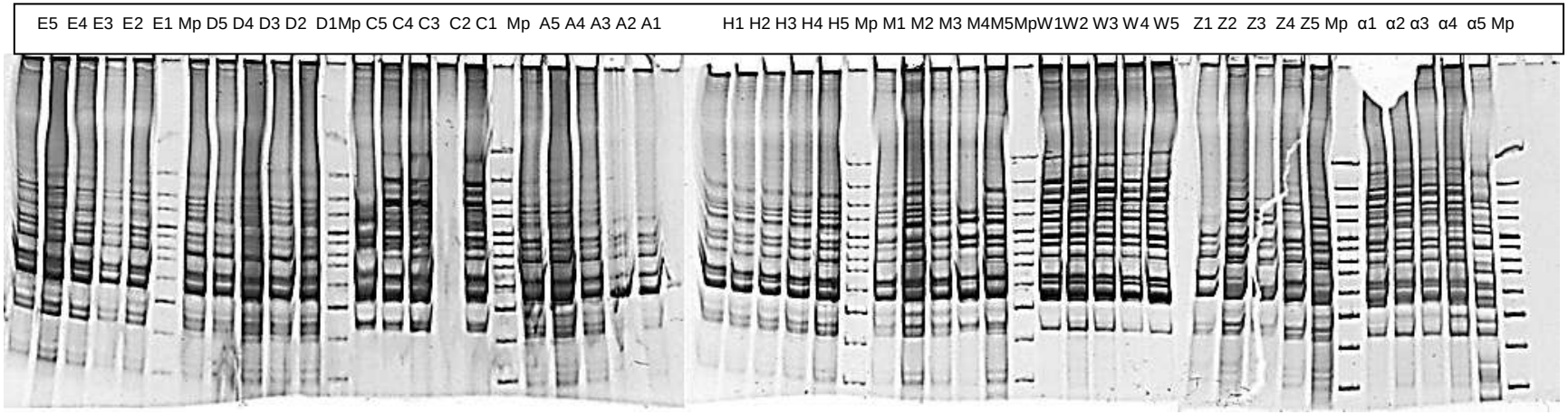



Figura 23. Gel de poliacrilamida Cebador CGA, con tinción con bromuro

Para obtener los valores de heterocigosidad esperada y % de loci polimórficos se corrido el programa TFPGA, obteniendo los resultados de la Tabla 14.

Tabla 14. Valores de heterocigosidad esperada y porcentaje de loci polimórficos de los materiales evaluados.

| Cebador | Heterocigosidad esperada He materiales superiores | % loci polimórficos (95%) materiales superiores | Heterocigosidad esperada He 23 sitios | % loci polimórficos (95%) 23 sitios |
|---|---|---|---|---|
| **TG** | 0,3309 | **94,1176** | | |
| AG | 0,31 | 81,25 | 0,3524 | 88,46 |
| **CT** | **0,1864** | 50,0000 | 0,3532 | 96,00 |
| CCA | **0,3717** | 59,0909 | 0,2942 | 81,48 |
| **CGA** | 0,1978 | **35,0000** | **0,2419** | **61,90** |
| **CA** | 0,3542 | 70,5882 | **0,4343** | **100,00** |
| **Total** | 0,3100 | 81,0345 | 0,3288 | 84,95 |

Se observa en la Tabla 14 y la Figura 24, que los valores más altos de heterocigosidad esperada para los materiales superiores fueron para los cebadores CCA (0,37), CA (0,35) y TG (0,33), mientras los valores más bajo fueron para los cebadores CT (0,18) y CGA (0,19), si lo comparamos con los datos obtenidos en los 23 sitios de muestreo el valor más alto de he fue dado por el cebador CA (0,43) y el más bajo para CGA (0,24), y el cebador TG no amplifico para la mayoría de las muestras de los 23 sitios, mientras el cebador AG dio valores altos de heterocigosidad, esto sugiere que el cebador que se debe utilizar en materiales superiores son TG, CCA, CA y AG.

En cuanto a el valor de polimorfismo encontrado en los materiales superiores (94.11% y 81.25%) en los cebadores TG y AG (Tabla 14 y Figura 25) respectivamente, permiten deducir que estos cebadores fueron los que más aportan a la diversidad y confirma que el cebador TG resulta apropiado para su utilización en la evaluación de la diversidad genética y estructura poblacional de materiales superiores de *G. angustifolia*.

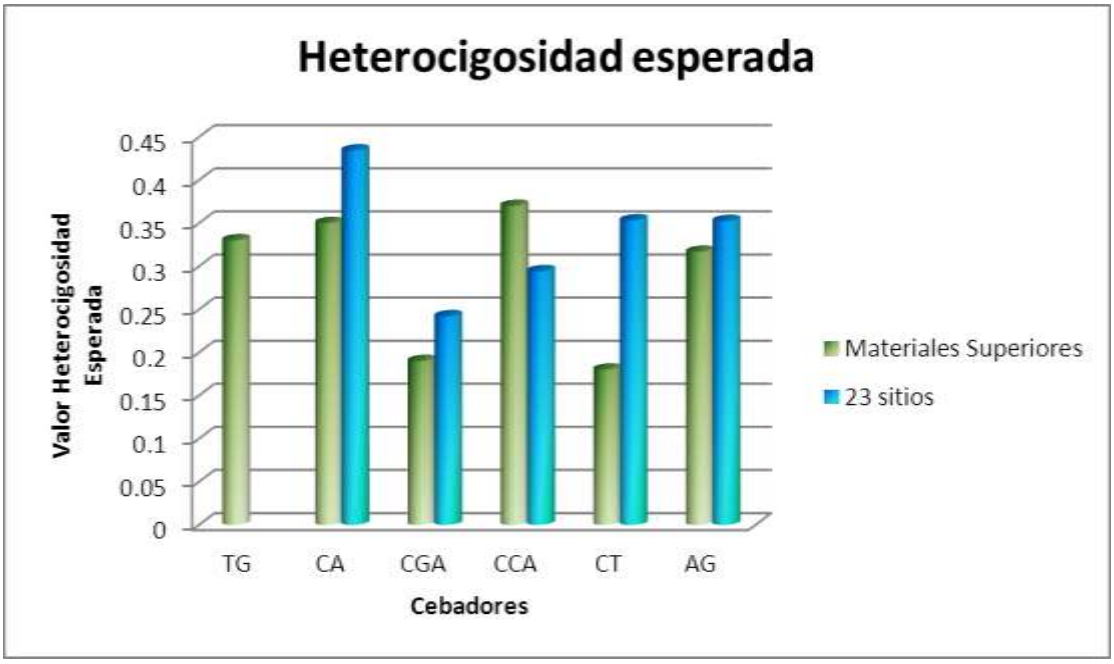



Figura 24. Valores de heterocigosidad de los materiales superiores y los 23 sitios de muestreo

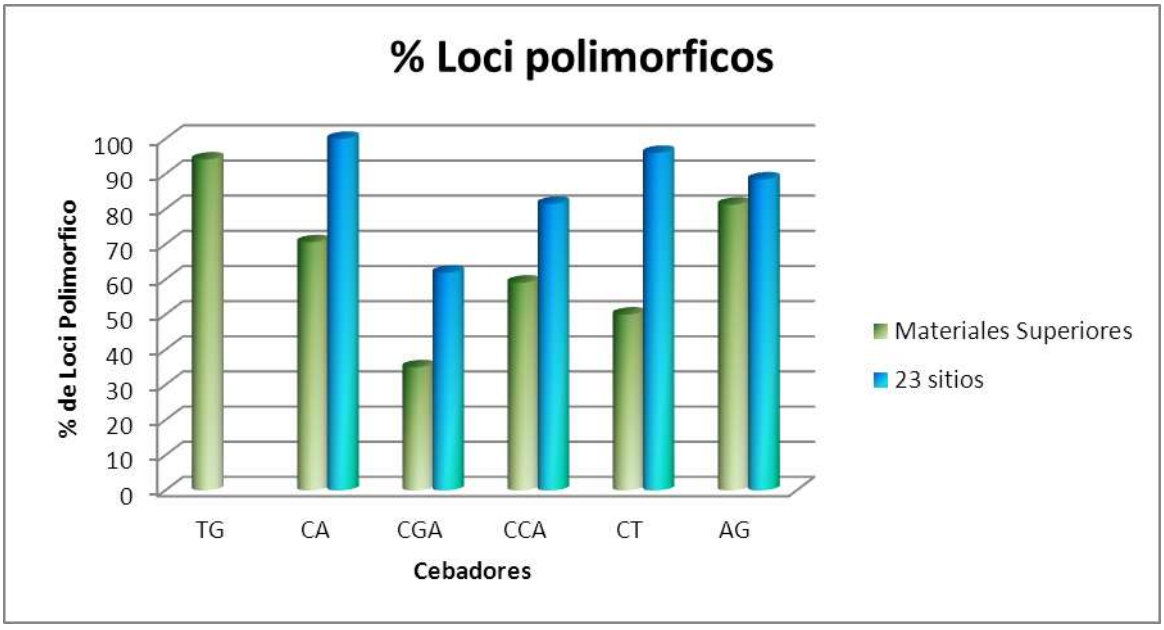



Figura 25. Porcentaje de Loci polimórficos de los materiales superiores y los 23 sitios de muestreo

Como podemos observar en la Tabla 14 el valor de Heterocigosidad para los nueve materiales superiores es del 0,31, lo que nos indica una alta diversidad de alelos en toda la población, mostrando que el material seleccionado esta formado por diferentes genotipos, y esta diversidad contribuye a crear poblaciones diferentes entre sí y asegurar

una buena sostenibilidad de los materiales en el tiempo, ya que al presentarse una plaga o enfermedad podrá ser menos el riesgo de ser afectada toda la población.

En cuanto al porcentaje de loci polimórficos, está confirmando la alta diversidad existente entre los 9 materiales seleccionados, indicando que el 81,03% de los casos el alelo más repetido tiene una frecuencia menor del 95%, es decir que hay una alta diversidad por la presencia de diferentes alelos en los nueve materiales seleccionados.

#### 1.3.3.5.2. Análisis descriptivo

Para el análisis descriptivo se realizó un dendrograma con el coeficiente de Dice Nei-Li (1978) y mediante el método de clasificación UPGMA. Como se observa en el dendrograma (Figura 26) los materiales superiores se agruparon con un porcentaje de similitud de 74%, se formaron dos grupos. El grupo A está conformado por la mayoría de los materiales superiores, mientras que en el grupo B se encuentran los materiales del sitio Z y dos individuos del sitio M. Algunos materiales no tienen diferenciación genética, lo que probablemente se explica con la procedencia vegetativa de estos individuos con un ancestro igual. El sitio Z fue el que presento un porcentaje de similitud más bajo y se agrupo muy apartado de los demás, lo que posiblemente indique que la procedencia de estos materiales es muy diferente al del resto de los sitios seleccionados.

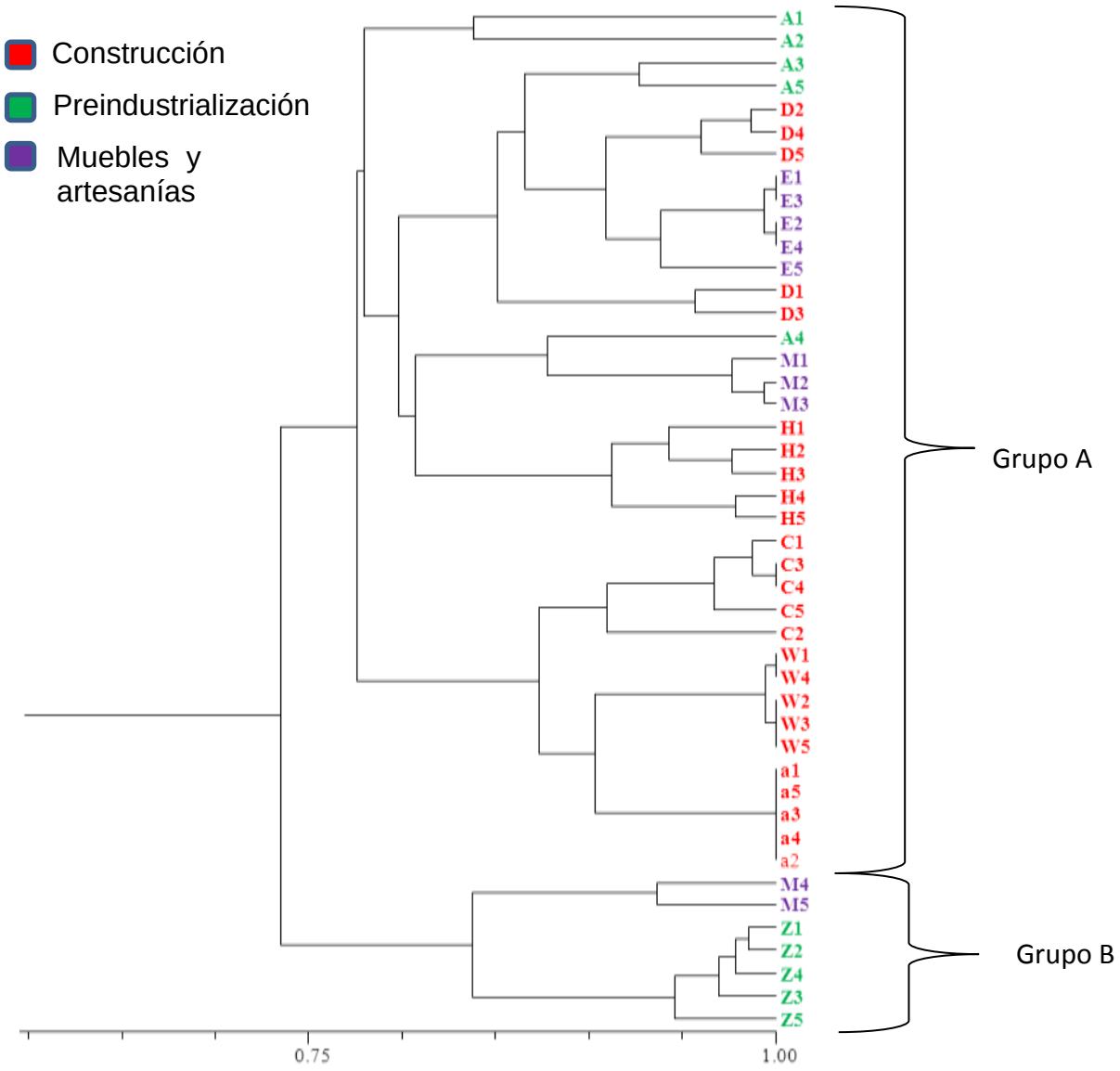



Figura 26. Dendrograma de los materiales superiores de *G. angustifolia.*

## 1.4. CONCLUSIONES

Se seleccionaron cinco cebadores RAMs polimórficos para la especie *Guadua angustifolia* (CA, CCA, CGA, CT y AG). CA y CT fueron los que más aporte realizaron a la diversidad por presentar los valores más altos de He (0,43 y 0,35) y polimorfismo (100% y 96%), lo que indica que son apropiados para realizar estudios estructura poblacional y diversidad genética en poblaciones naturales.

Para los materiales superiores se seleccionaron seis cebadores RAMs, de los cuales cuatro son los más apropiados (TG, CCA, CA y AG). Los altos valores proporcionados por TG en cuanto a He (0,33) y 94 % de loci Polimórficos lo hace muy útil en la evaluación de la diversidad genética de materiales superiores.

En el análisis del dendrograma realizado con el coeficiente de Dice Nei-Li para todos los sitios colectados se evidenció la formación de siete grandes grupos a un nivel de similitud de 75%, mostrando que no existe una relación estrecha entre los agrupamientos formados y los departamentos de procedencia, ya que los individuos provenientes de diferentes zonas geográficas se encontraron distribuidos a lo largo del dendrograma, el análisis no permitió la discriminación de los individuos de los sitios Alfa y O, ya que presentaron una similitud del 100%.

En el dendrograma de los materiales superiores se observa que los individuos de cada sitio seleccionado se muestra muy similar al de toda la población, también se tienen dos grandes agrupaciones con un porcentaje de similitud del 74%.

El valor de Fst encontrado en este estudio fue de 0.1771 (D.S= 0,0163; 1000 replicaciones), lo que indica que existe una alta diferenciación genética de los grupos. Este valor confirma la conformación de subpoblaciones por origen geográfico, y que a pesar que la mayoría de estos se reproducen vegetativamente, es probable que el flujo genético se haya dado principalmente por la producción masiva de semillas que pueden ser transportadas por corrientes de agua o por dispersión.

El análisis de varianza molecular para los cuatro grupos indicó que la variación existente en las poblaciones obedece a diferencias propias de los individuos dentro de cada uno de los grupos (86%). El 14% restante se debe al componente de varianza genética entre grupos, la cual no fue significativa (P> 0.01), indicando que no existe una diferenciación genética entre los cuatro grupos de poblaciones de guadua evaluados.

El análisis mediante marcadores moleculares RAMs permitió detectar la variabilidad genética de las muestras colectadas en el Eje Cafetero y mostró un alto grado de polimorfismo y sensibilidad para su discriminación. Por lo anterior esta técnica puede ser considerada como una herramienta útil para evaluar la diversidad genética de bancos de germoplasma y poblaciones naturales.

**BIBLIOGRAFÍA**


BARKLEY, N. A., NEWMAN, M. L., HOTCHKISS, M. W., & PEDERSON, G. A. 2005. Assessment of genetic diversity and phylogenetic relationship of a temperate bamboo collection by using transferred EST-SSR markers. Genome (48):731–737.

BONILLA, M. L., ESPINOSA K., POSSO, A. M., VÁSQUEZ, H., & MUÑOZ, J. E. 2008. Caracterización molecular de 43 accesiones de uchuva de seis departamentos de Colombia. Acta Agronómica (Palmira) 57(2): 109-115.

BONILLA, M; ESPINOSA, K; MUÑOZ, J; VASQUEZ, H; POSSO A. 2004. Colección, caracterización morfológica y molecular de poblaciones de Uchuva Physallis peruviana L. Biotecnología en el sector Agropecuario y Agroindustrial. 2: (1). 70-76.

CASTAÑO, F. & R.D. MORENO. 2004. Guadua para todos. Cultivo y aprovechamiento. Bogotá, DC. Pp. 190.

CAUJAPE, J. 2006. Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones. EXEGEN Ediciones. Las Palmas de Gran Canaria. España.

CRUZ, H. 1994. La Guadua. Nuestro Bambú. Corporación Regional del Quindío. Fudegraf, Armenia, Colombia.

DELLAPORTA, S. L., WOOD, J., & HICKS, J. B. 1983. A plant DNA minipreparation: Versión II. *Plant. Molec. Biol. Rep*. (14): 19-21.

FRIAR, E., KOCHERT, G. 1991. Bamboo germplasm screening with nuclear restriction fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet (82):697–703

GIELIS, J., EVERAERT, I. GOETGHEBEUR, P., & DELOOSE, M. 1997b. Bamboo and molecular markers. In: Ramanuja Rao and Cherla B. Sastry. (Eds). Bamboo, people and the Environment. International Network of Bamboo and Rattan INBAR Tecnical Report Nº 8. Pp 45 – 67.

GIRALDO, E., & A. SABOGAL. 1999. Una alternativa sostenible: La Guadua. una alternativa sostenible Corporación Autónoma Regional del Quindío-CRQ.

GOMEZ, G. D. & AGUDELO, C. A. 2003. Aspectos fenológicos de "*Guadua angustifolia".* Revista de investigación Universidad del Quindío. Vol 4, Nº 12. Pp 9 – 21.

GOMEZ, G.D., CRUZ, SM., AGUDELO, C.A., & GIRALDO, E. 2001. Caracterización morfológica y anatómica de cuatro biotipos de *Guadua angustifolia* Kunth. En: Monografías de la Flora Andina, Vol 3. Universidad del Quindío. Pp 119 -159.

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.

GRITSCH, A.S., K.ABRANSON, G.C. CAMAYO, M. RASHID, R.J. MURPHY, J.C. CAMARGO & X. LONDOÑO. 2004. Anatomical culm analysis of *Guadua angustifolia* in relation to age, site, and physico-mechanical properties. En Memorias. Simposio Internacional Guadua 2004, Pereira, Septiembre 27 a 2 Octubre, 2004. Pp. 188-193.

HANTULA, J., DUSABENYAGASANI, M., HAMELIN R.C. 1996. Random Amplified Microsatellites (RAMs) a novel method for characterizing genetic variation within fungi. Eur Path. (26): 159-166.

HEARNE, C. M.; GHLOSH, S.; TODD. J. A. 1992. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. Trend Genet. (8): 288-294.

HENRÍQUEZ, N. 2000. Diversidad genética de *Phaeoisariopsis griseola* (Sacc.) Ferraris utilizando marcadores moleculares. Trabajo de grado (Ing. Agronómica) Palmira: Universidad Nacional de Colombia. Pp 102.

HIDALGO, O. 1974. Bambú. EdItalgraf. Cali – Colombia.
HOLDRIDGE, L.R., GRENKE, W., HATHEWAY, W.H., LIANG, T. & TOSI, J.A. 1971. Forest Environments in Tropical Life Zones: A Pilot Study. Pergamon Press, Oxford.

IMBAR. 2004. Bamboo Diversity, Africa, Madagascar and the Americas.

INBAR 2006. In Partnership for a better World – Strategy to the year 2015. Beijing, China.

JOHNSON, E. L., SAUNDERS, J. A., MISCHKE, S. HELLING, C. S., & EMCHE, S. D. 2003. Identification of *Erythroxulum* taxa by AFLP DNA analysis. Phytochemistry (64). Pp 187 – 197.

JOSEPH, J.D., ANDERSON, R., TATHAM, R., & BLACK, W. 1992. Multivariate data Analysis with Readings. 3rd ed. USA. 554 p.

JUDZIEWICZ, E., L.G. CLARK, X. LONDOÑO, & M. J. STERN. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington & London. 392 pp.

KHASA, P. D. & DANCIK, B. P. 1996. Rapid identification of White Engelmann spruce species by RAPD markers. Theoretical and Applied Genetics (92): Pp 46 – 52.

KLEINN C. & MORALES D. 2006. An inventory of Guadua ( *Guadua angustifolia*) bamboo in the CoffeeRegion of Colombia. Eur J Forest Res (2006) 125: 361–368. DOI 10.1007/s10342-006-0129-3. Received: 28 February 2005 / Accepted: 17 February 2006 / Published online: 20 April 2006_ Springer-Verlag 2006

KOBAYASHI M. 1997. Phylogeny of world bamboos analyzed by restriction fragment length polymorphism of chloroplast DNA. In: Chapman GP (ed) The bamboos. Linnaean Society, London, pp 227–234.
KOCHERT, G. 1994. A study of genetic variation and evolution of Phyllostachys Bambusoideae: Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet (89):265–270

KRAIC, J.; SAKOVA, M., GREGOVA, E. 1998. Comparison of differentiation capability or RAPD and SSR markers in commercial barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars. *Cereal Res Commun*. (26): 375-382.

LAI, C. C., & HSIAO, J. Y. 1997. Genetic variation of Phyllostachys pubescens (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan based on DNA polymorphisms. Bot Bull Acad Sin (38):145–152

LEUNG, H., NELSON, R. H., & LEACH, J. E. 1993. Population structure of plant pathogenic fungi and bacteria. *Adv Plant Pathol* (10):157-205.

LIN, X. C., RUAN, X.S., LOU, Y. F., GUO, X. Q., & FANG, W. 2009. Genetic similarity among cultivars of Phyllostachys pubescens. Plant System Evolution (277):67–73.

LOH, J. P., KIEW, R., SET, O., GAN, L. H., & GAN, Y. Y. 2000. A study of genetic variation and relationships within the bamboo subtribe Bambusinae using amplified fragment length polymorphism. Ann Bot (85):607–612.

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 (Poaceea: Bambusoideae). Caldasia 16 (77):139-153.

LONDOÑO, X. & CLARK, L.G. 1998. Eight new taxa and two newreports of Bambusae (Poaceae: Bambusoideae) from Colombia. Novon (8): 408 – 428.

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

LONDOÑO, X. 1998. A decade of observations of a *Guadua angustifolia* plantations in Colombia. En: The Journal of the American Bamboo Society, Vol. 12 (1), p. 37-42.

LONDOÑO, X. 2000. La Guadua Un gigante dormido. Memorias Seminario Guadua en la Reconstrucción. Armenia. Quindío.

LONDOÑO, X. 2004a. La subtribu Guaduinae de América. En Memorias. Simposio Internacional Guadua 2004, Pereira, Colombia. Pp. 76-83.

LONDOÑO, X. 2004a. La subtribu Guaduinae de América. En Memorias. Simposio Internacional Guadua 2004, Pereira, Colombia. Pp. 76-83.

LONDOÑO, X. 2010. Comunicación personal. Sociedad Colombiana del Bambu.

LONDOÑO, X., G. C. CAMAYO, N. M. RIAÑO AND Y. LOPEZ. 2002. Characterization of the anatomy of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) culms. Bamboo, Science and Culture. The Journal of the American Bamboo Society 16 (1): 18-31.

Mahuku, G.S., Henríquez, M. A., Muñoz, J. & Buruchara, R.A. 2002. Molecular markers dispute the existence of the Afro-Andean group of the Bean Angular Leaf Spot pathogen, *Pha**eoisariopsis griseola*. *Phytopathology* 96 (6): 580-589.

MARULANDA, M. & URIBE, M. 2010. *Guadua angustifolia* Kunth Aspectos biológicos. En: Biodiversidad y Biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira. Pp. 17 - 30.

MARULANDA, M. L. & GUTIERREZ, L. G. 2010. Propagación vía brotación de yemas axilares. En: Biodiversidad y Biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira. Pp.33 -42.

MARULANDA, M. L. & LOPEZ, A. M. 2010 Estimación de la variabilidad genética en especies y genotipos del género *Guadua* en Colombia, con marcadores moleculares AFLP. En: Biodiversidad y Biotecnología de la *Guadua angustifolia* Kunth. Universidad Tecnológica de Pereira. Pp.57 - 76.

MARULANDA, M. L., MARQUEZ, P., & LONDOÑO, X. 2002. AFLP analysis of Guadua angustifolia (Poaceae: Bambusoideae) in Columbia with emphasis on the coffee region. Bamboo Science and Culture 16(1):32–42.

MCCLURE, F. A. 1973. Genera of Bamboos Native to the New World (Gramineae: Bambusoideae). Edited by Thomas R. Soderstrom. Smithsonian Contributions to Botany number 9.

MORALES, D. & C. KLEINN. 2004. Inventario de las existencias de Guadua angustifolia en el Eje Cafetero de Colombia. En: Universidad Tecnológica de Pereira. Memorias Simposio Internacional Guadua, Septiembre 27-Octubre 2, 2004. Pereira, Colombia. Pág. 85-105.

MORENO, R. D. 2006. Lineamientos Generales para la Conformación y Operación de Núcleos Forestales productivos para la Guadua. Proyecto Manejo Sostenible de Bosques en Colombia. Programa Ambiental GTZ. Pereira. Pp. 64.

MORENO, Y., MELGAREJO, L. M., HERNÁNDEZ, M. S., QUINTERO, L. & VARGAS, G. 2004. Caracterización molecular de un banco de germoplasma del género Theobroma mediante la técnica RAPD. Revista Colombiana de Biotecnología 4 (2): 15-24.

MORGANTE, M.; OLIVIERI, A.M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. Plant Journal (3): 175-182.

MORILLO A., MORILLO Y., MUÑOZ J. E., VASQUEZ H., POSSO A. 2003. Caracterización molecular de poblaciones de mora Rubus spp mediante marcadores moleculares tipo RAMs. En: III Congreso Colombiano de Botánica, Popayán. Memorias del III Congreso Colombiano de Botánica.

MORILLO, Y., MORILLO, A. C., MUÑOZ, J. E., VASQUEZ, H. D., ZAMORANO, A. 2005. Caracterización molecular con microsatélites aleatorios RAMs de la colección de mora, Rubus spp, de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. Acta Agronómica 54 (2).

MUKHERJEE, A. K., RATHA, S., DHAR, S., DEBATA, A. K., ACHARYA, P. K., MANDAL S., PANDA, P. C., & MAHAPATRA, A. K. 2010. Genetic Relationships Among 22 Taxa of

Bamboo Revealed by ISSR and EST-Based Random Cebadors. In: Biochem Genet (48). Pp 1015–1025.

MUÑOZ F. J. E., MORILLO A. & MORILLO Y. 2008. Microsatélites amplificados al azar (RAM) en estudios de diversidad genética vegetal. Acta Agronómica ISSN: 0120-2812, vol: 57(4): 219 – 226. Universidad de Colombia Sede Palmira.

MUÑOZ, J. E., & LONDOÑO, X. 2008. Proyecto "Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de Guadua angustifolia Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia", financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

NAYAK, S., & ROUT, G. R. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in Bambusa arundinacea and cross species amplification in other bamboos. Afr J Biotech 4(2):151–156.

PALACIO, J. D. 2006. Comunicación personal. Instituto de Investigaciones Biológicas Alexander von Humboldt. CIAT.

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

PÉREZ FLOREZ A. M. 2006. Guadua angustifolia Kunth, 1822. http://www.siac.net.co/sib/catalogoespecies/especie.do?idBuscar=280&method=displayAT

PÉREZ PALACIO, O. 1979. "Una Posibilidad económica". Corporación Regional Autónoma para la defensa de las ciudades de Manizales, Salamina y Aranzazu. CRAMSA. Manizales, Colombia.

POSSO, A. M. 2010. Diversidad genética de accesiones de nacedero Trichanthera gigantea (humb. & bonpl.) nees mediante RAM´s (random amplified microsatellites). Tesis de grado. Universidad del Valle.

POTOSI, C.T. 2005. Variabilidad de la guadua (Guadua angustifolia Kunth) en la cuenca Cauca, departamento del Cauca. Tesis. Universidad Nacional de Colombia. Palmira.

RAINA, S. N., RANI, V., KOJIMA, T., OGIHARA, Y., SING, K. P. & DEYARUMATH, R. M. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (Arachis hypogaea) cultivars and wild species. Genome (44). Pp 763 – 772.

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

RAO, A.N., V. R. RAO & J.T. WILLIAMS. 1998. Priority species of bamboo and rattan. Pp.95. IPGRI & INBAR.

RAO, V.R. &, A,N. RAO. 1995. Bamboo and Rattan Genetic Resources and Uses. Proceeding of the INBAR Biodiversity, Genetic Resources and Conservation Working Group, 7-9 November 1994, Singapore. Pp.77.

RESTREPO, E. 2003. Estudio de la diversidad del tomate cultivado tipo chonto Lycopersicum esculentum en las zonas productoras de Colombia. Trabajo de Maestría en Recursos Fitogenéticos Neotropicales. Universidad Nacional de Colombia, Sede Palmira.

ROXAS C. 1998. Conservation and imporvement of bammboo genetic resources in the Philippines. En Edit. K. Vivekanandan, A.N. Rao & V. R. Rao.

RUEDA, E., MUNOZ, J. E., SAAVEDRA, R., PALACIO, J. D., BRAVO, E. 2006. Caracterización molecular del banco de germoplasma de guayaba Psidium spp del centro de investigación Corpoica-Palmira. Fitotécnia Colombiana (6): 2-9.

SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F., & MANIATIS, T. 1989. Gel Electrophoresis of DNA. In: Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. (eds.). Molecular Cloning: a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. Pp 3-60.

SAMEC, P. & NASINEC, V. 1996 The use of RAPD technique for the identification and classification of Pisum sativum L. genotypes. Euphytica (89). Pp 229 – 234.

SANABRIA, H., MUÑOZ J. E., VASQUEZ H. & POSSO A. 2006. Caracterización molecular de poblaciones de GUAYABA Psidium guajava mediante marcadores moleculares tipo RAMs. En: Memorias XL Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, 2005, Cali.

SHARMA, R. K., GUPTA, P., SHARMA, V., SOOD, A., MOHAPATRA, T., & AHUJA, P. S. 2008. Evaluation of rice and sugarcane SSR markers for phylogenetic diversity analyses in bamboo. Genome (51): 91–103.

SNEATH, P. H. A., & SOKAL, R. R. 1973. Numerical Taxonomy: The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W.H. Freeman. 573 p.

SODERSTROM T. R., JUDZIEWICZ E. J., Clark L. G. 1988. Distribution Patterns of Neotropical Bamboos

SUYAMA, Y., OBAYASHI, K., & HAYASHI, I. 2000. Clonal structure in a dwarf bamboo (Sasa senanensis) population inferred from amplified fragment length polymorphism (AFLP) fingerprints. Molecular Ecology (9): 901–906.

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

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

Zietkiewicz, E., Rafalski A. & Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-anchored Polymerase Chain Reaction Amplification. Chain Reaction Amplification. Genomics (20): 176-183.

# 2. CAPITULO II

## MULTIPLICACIÓN DE MATERIALES SUPERIORES DE *Guadua angustifolia* Kunth, Y ESTABLECIMIENTO DEL DUPLICADO DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE GUADUA.

## INTRODUCCIÓN

La Guadua, por ser el bambú leñoso del neotrópico constituye el género de bambú nativo más importante de América tropical, es endémica de este continente, con aproximadamente 30 especies distribuidas desde México hasta Argentina, las cuales se pueden encontrar en un rango de altitud que va desde el nivel del mar hasta los 2.200 m.s.n.m. (Londoño 1998). Es considerada el tercer bambú más grande del mundo, superada únicamente por dos especies asiáticas. La guadua es una gramínea gigante que puede alcanzar más de 30 metros de altura y cuyo diámetro puede variar de uno a 22 centímetros (Hidalgo 2003).

En Colombia, la *Guadua angustifolia* Kunth se encuentra desde el nivel del mar hasta los 2000 m.s.n.m. La especie requiere de suelos sueltos, fértiles, con mediana profundidad, húmedos pero no inundables. Los suelos derivados de cenizas volcánicas y aluviales son los preferidos por la especie, especialmente suelos areno-limosos y arcillo-limosos de color amarillo o amarillo - rojizos. El promedio mínimo de precipitación requerido es de 1300 mm, bien distribuidos y el promedio máximo es de 5000 mm El rango óptimo de temperatura oscila entre 20 y 26 ºC y una humedad relativa de 80% (Nieto, 1985).

A partir de los nueve materiales superiores de G. *angustifolia* seleccionados en el proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, se realizó la multiplicación de estos materiales en el invernadero de la Universidad Nacional, para su posterior establecimiento en parcelas de ensayos de rendimiento en cuatro eco-tipos del Eje Cafetero. También se realizó el establecimiento de un duplicado del banco de germoplasma de Bambúes del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá (Valle del Cauca).

## 2.1 ESTADO DEL ARTE

Muchas de las especies de bambúes de las Américas están en la lista roja de Bambús “en peligro”, de las 20 especies que se encuentran en ella, 12 son bambúes leñosos (Gillet y Walter 1998; Hilton-Taylor 2000).

A lo largo del continente Americano, los bambúes leñosos son una parte importante de los ecosistemas forestales y se presentan en rodales casi homogeneos. En algunos lugares de la región Amazónica ocupan áreas entre 121.000 y 180.000 $KM^2$ (Nelson, 1994; Judziewicz *et al.,* 1999). Esta vegetación dominada por los géneros *Guadua elytrostachys* y G. *arthrostylidium*, es densa y a
Menudo impenetrable. En el norte de América del Sur, especialmente Colombia y Ecuador, el 'guadual' – es un bosque denso dominado por *G. angustifolia*, estos bosques son importantes como refugios de vida silvestre (Judziewicz *et al.,* 1999).

### 2.1.1. Generalidades

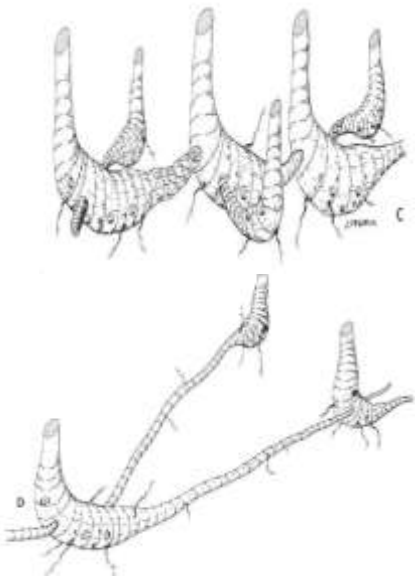
En Colombia los guaduales son los principales bosques de la región y las pequeñas fincas cafeteras, además de la alta complejidad ecológica que les son inherente, existe un gran potencial para la conservación de la biodiversidad de flora y fauna, protección de agua y suelos, además de la variedad de beneficios culturales no tangibles que proveen para los mismos productores y pobladores (Giraldo & Sabogal, 1999).

#### 2.1.1.1. Composición botánica

##### 2.1.1.1.1. El rizoma

La guadua pertenece a las rizomatosas de tipo paquimorfo; el rizoma es la base principal del tallo o culmo y asegura su estabilidad, con nudos y entrenudos bajo la superficie de la tierra de donde se desprenden las raíces y raicillas. Es comúnmente conocido como el caimán de la Guadua, además de ser el órgano almacenador de nutrientes es el elemento apto para la propagación asexual (Figura 27) Perea *et al.* (2008).

Red de rizomas



Paquimorfo cuello corto

Paquimorfo cuello largo

Figura 27. Diferentes formas de rizoma en la guadua.

#### 2.1.1.1.2. Las raíces

Dependiendo del suelo en que se encuentre pueden alcanzar un grosor de 5 mm, y profundidades hasta de 1.50 metros parte de ellas se profundizan y otras se extienden de forma horizontal, Perea *et al.* (2008).

#### 2.1.1.1.3. El tallo

Es de forma cilíndrica y cónica, con entrenudos huecos denominados tabiques y nudos esparcidos de forma transversal que garantizan mayor rigidez, flexibilidad y resistencia de los tallos. El culmo, tallo o Guadua esta formado por fibras longitudinales que de acuerdo a su edad (juvenil, hecha, madura) se lignifican, entregándonos una extraordinaria resistencia en la parte maderable y en la cara exterior Figura 28, Perea *et al.* (2008).

Figura 28. Culmos de guadua.

#### 2.1.1.1.4. Las ramas

A diferencia del tallo son macizas, en algunos casos se atrofian y son reemplazadas por unas espinas de 10 o 15 centímetros, sus ramas son muy especiales, crecen casi solitarias Figura 29, Perea *et al.* (2008).

Figura 29. Ramas o riendas de las guaduas.

### 2.1.1.1.5. Las hojas

Son de color verde especial, inconfundible en la distancia y en medio de otras plantaciones, sobresale el color de sus hojas, generalmente las hojas tienen la punta muy similar a una lanza, por lo tanto son hojas lanceoladas y lisas Figura 30. Las hojas aportan a su vez la denominada biomasa de la hoja (en un año 4 kilos por 1 metro cuadrado) transfiriendo nutrientes al suelo y demás plántulas que las rodean, Perea *et al.* (2008).

Tiene otro tipo de hojas denominadas caulinares que son las que cubren el tallo desde su nacimiento hasta su madurez, son de color café, provistas de pelusillas como sistemas de defensa figura 30.

Figura 30. Hojas lanceoladas y caulinares de *G. angustifolia.*

#### 2.1.1.1.6. La semilla

Se asemeja a un grano de arroz (es una gramínea) de coloración blancuzca muy clara en su interior y con un café muy claro en su exterior, es de aproximadamente5 y 8 milímetros de larga y 3 milímetros de espesor Figura 31, Perea *et al.* (2008).

Figura 31. Semilla de *G. angustifolia*

#### 2.1.1.1.7. Las flores

La flor es de color violáceo o rosáceo, dependiendo de la calidad del suelo donde esta plantada, es de vida muy corta, dura aproximadamente 48 horas, está ubicada en las partes terminales de las ramas superiores y en el primer tercio de la espiga Figura 32, Perea *et al.* (2008).

Figura 32. Inflorescencia de la *G. angustifolia.*

### 2.1.1.2. Beneficios ambientales

*G. angustifolia* es considerada una de las especies más dinámicas y especializadas de la zona andina colombiana, en cuanto a su sostenibilidad, su oferta ambiental y su relación con otros seres vivos. Se han registrado más de 1.000 especies de flora asociadas a los guaduales en Colombia (C.R.Q.).

Muchos mamíferos conviven en los guaduales y su flora asociada, entre ellos se destaca los monos aulladores, guatines, ardillas, armadillos, guaguas, conejos silvestres, zarigueyas y murciélagos. Por la facilidad para hacer sus nidos, muchas aves viven en los bosques de guadua, como los pájaros carpinteros real y payaso, azulejos, loros, pericos búhos, barranquillos y mirlas. Varias especies de reptiles y anfibios tienen su hábitat en los guaduales por sus condiciones de humedad (C.R.Q.).

Otros servicios ambientales son la regulación hídrica, ciclaje de nutrientes, estructuración de suelos, aporte de biomasa, captación de CO2 y calidad del paisaje, entre otros (C.R.Q.).

#### 2.1.1.2.1. Diversidad

Varios estudios han señalado la importancia de los bosques dominados por guadua para la conservación de la biodiversidad (Ospina y Finegan 2004). Los estudios de Villa *et al.,* 1998 muestran que en un mismo bosque se presentan varios ecosistemas determinados principalmente por el nivel de dominancia de la guadua.

La composición florística de 14 guaduales a través del Eje Cafetero colombiano según Ospina & Finegan (2004) en 140 parcelas de 20 m x 20 m, es de 26 familias y 63 especies a partir de 10cm DAP (diámetro a la altura del pecho). Las familias Moraceae, Mimosaceae y Lauraceae fueron las más abundantes. Las seis especies de mayor abundancia y frecuencia fueron *Pseudolmedia rigida* (Moraceae), *Cupania americana* (Sapindaceae), *Oreopanax albense* (Araliaceae), *Trichilia pallida* (Meliaceae), *Aiphanes aculeata* (Arecaceae) y *Anacardium excelsum* (Anacardiaceae). Un alto porcentaje de la vegetación del sotobosque correspondió a vegetación de regeneración, lo cual resalta la importancia de los guaduales para la regeneración de especies arbóreas escasas de la zona como *Poulsenia armata*, *Chrysophyllum argentum* y *Pouteria torta,* comunes en bosques naturales maduros.

### 2.1.1.2.2. Protección del suelo

Los guaduales producen y aportan al suelo entre 2 y 4 ton/ha/año de biomasa (10-14 % de la biomasa total); el aporte anual general de biomasa oscila entre 30 y 35 ton/ha/año; la naturaleza y la textura orgánica de los suelos propicia la retención y filtración del agua (Giraldo & Sabogal 1999).

En la zona cafetera del Quindío (Colombia) los bosques nativos y los guaduales presentaron la más alta actividad microbiana - CO2 y estabilidad estructural. En este agroecosistema también se detectaron los mayores promedios de diversidad de organismos (mesofauna), materia orgánica, contenido de humedad, porosidad y conductividad hidráulica. En términos de densidad aparente, resistencia a la penetración en los primeros 20 cm de profundidad, fue menor frente a otros agroecosistemas tradicionales de la región (café, plantaciones de pino, pasturas, etc.) (Sadeghian *et a.,* 1999).

El sistema entretejido de rizomas y raicillas origina una malla que les permite comportarse como muros biológicos de contención que previenen la erosión (Giraldo & Saboga,l 1999). También el denso dosel formado por el follaje es especialmente importante en la regulación de la dinámica del agua superficial en las riveras de los ríos y en las nacientes disminuyendo la evaporación (Castaño, 2002)

.

### 2.1.1.2.3. Calidad y cantidad de agua

La cobertura forestal del guadual propicia una amplia regulación hídrica, protege los caudales superficiales, así como la Tabla de agua. El volumen promedio de agua superficial en los primeros 5 cm de profundidad bajo guaduales se estima en 180 m3/ha (Giraldo & Sabogal 1999).

El suelo bajo rodales de guadua posee una estabilidad estructural y de agregados al agua, alta capacidad de almacenamiento de agua, alta porosidad total, baja densidad aparente, alta conductividad hidráulica saturada y alto contenido de materia orgánica (Rodríguez & Sepúlveda, 2004).

Un servicio ambiental muy particular de ésta especie es su capacidad para almacenar agua potable dentro de los culmos. Durante la época húmeda absorbe importantes volúmenes de agua que almacena tanto en su sistema rizomatoso como en el tallo (Giraldo & Sabogal, 1999). Una hectárea de guadual puede almacenar 30.375 litros de agua potable, suponiendo un consumo promedio diario de 200 litros/persona/día.

#### 2.1.1.2.4. Captura de carbono

En rodales de guadua se puede encontrar en promedio aproximadamente 560 toneladas de $CO_2$ en los primeros 50 cm de profundidad del suelo. El contenido de carbono en el suelo tiende a aumentar cuando las condiciones ecológicas de altitud y precipitación son mayores. Además, el aprovechamiento de los guaduales no afecta de forma negativa el contenido de carbono edáfico. Por el contrario, un manejo adecuado de los guaduales podría traer beneficios tanto socio-económicos como ambientales (Arias & Hoyos, 2004).

Un año después de establecida una plantación se presenta un incremento aproximado de 4 toneladas de $CO_2$ por hectárea en los primeros 50 cm de profundidad del suelo. Londoño *et al.,* (2002) reportaron para una plantación establecida en el Valle del Cauca, que la parte aérea y superficial de *G. angustifolia* puede fijar 54,3 toneladas de $CO_2$ por hectárea en un período de 6 años.

### 2.1.1.3. Reproducción

La guadua se puede propagar mediante semilla y por propagación vegetativa, inclusive hasta por cultivo de tejidos. Sin embargo, la reproducción por semilla es difícil porque los guaduales florecen y fructifican esporádicamente (Nieto, 1985).

Según Nieto (1985) se han ensayado varios sistemas de reproducción asexual, entre ellos:

- Rizoma solo. Se obtiene del sistema radicular de guaduales naturales. Un hombre puede obtener de 4 a 10 unidades por día. La eficiencia en términos de supervivencia puede ser del 100%.

- Rizoma y parte de tallo. Los propágulos se obtienen de tallos con uno o dos años de edad, siendo necesario que el rizoma contenga una yema sana como mínimo. Los tallos se cortan de 60 a 90 cm de longitud. La rapidez y eficiencia son iguales al método anterior.

- Sección de guadua (caña) con uno, dos o tres entrenudos completos que contengan yemas buenas. En la parte superior de cada entrenudo se perfora un hueco hasta los dos terceras partes; posteriormente se recubre con tierra y se riega la superficie con agua. Las cañas se pueden sembrar vertical u horizontalmente. Para este método se requieren cañas jóvenes de dos a tres años.

- Ramas jóvenes con o sin fragmento de ramas laterales. Este sistema y sus variantes tienen una eficiencia baja, debido posiblemente a la deshidratación que sufre el material desde que se corta hasta el momento de plantación.

- Segmento de tallo delgado con rizoma basal, con una o varias yemas activas. Estos propágulos se obtienen de las plántulas o emergen después del aprovechamiento del guadual, siendo los tallos de conformación diferentes a los guaduales naturales por escaso diámetro y por no presentar espacio vacío en su interior. Se le conoce con el nombre de "chusquín" o "matabamba", los cuales se pueden extraer con la ayuda de una herramienta sin maltratar las yemas.

De todos los sistemas, el último se presenta como el más ventajosos para los programas de reforestación a gran escala, debido a su facilidad de obtención y transporte, alta eficiencia (100%) y economía (40-50 propágulos/hombre/día), además de que por su tamaños se pueden embolsar con su pedazo de tierra para ser plantados en las épocas de lluvias o más favorables. Para facilitar su manejo el tallo puede ser cortado a pocos centímetros por encimas del cebador nudo o tabique. Las principales actividades en vivero consisten en riego, limpias y regulación de la sombra (Nieto, 1985).

#### 2.1.1.3.1. A partir de plántulas (chusquines) de *Guadua angustifolia*

De todas las formas investigadas como alternativas de propagación se ha descubierto que la propagación por chusquines y el método de ramas basales o "riendas laterales" son las opciones más prácticas, económicas y eficientes (Nieto, 1985).

El término “chusquín” se tomó del parecido morfológico existente entre los primeros estados de desarrollo de una plántula de Chusque con un brote basal del rizoma de la guadua. Los Chusquines comienzan a emerger de brotes basales del rizoma a los dos o tres meses cuando a este se le ha cortado el culmo o sea el tallo aéreo de la planta. Los chusquines entonces son plántulas pequeñas con una altura máxima de 30 cm un solo talluelo y pocas hojas (Nieto, 1985).

#### 2.1.1.3.2. Propagación por el método de ramas basales o "riendas laterales".

Los tallos aéreos de la guadua muestran en el cuarto inferior, unas ramas basales llamadas normalmente "riendas laterales" o "ganchos". Estas ramas tienen crecimientos distintos a las ramas superiores o apicales, pues crecen paralelas al suelo y luego por su peso se entierran. Tienen funciones de protección y propagación de la planta (Nieto, 1985).

Los pasos a seguir son:

- Se selecciona la planta con características vigorosas, sanas y bien desarrolladas, con un buen número de ramas basales en el cuarto del culmo o tallo aéreo.

- El método técnico consiste en cortar las ramas basales intermedias (4 a 6), pues son las que mejor responden a este sistema de propagación. Esta labor se realiza con una tijera podadora o machete afilado, evitando cortar la rama en el punto de unión con el tallo aéreo, pues está herida puede facilitar el ataque de patógenos a la planta.

- Obtenidas las ramas medias se subdividen a su vez en tercio basal, medio y distal. Del tercio medio se toman todos los propágulos posibles. Estas secciones consisten en trozos de ramas de 2 o 3 cm de longitud, con presencia de nudo y de tres espinas por nudo. A los propágulos se les efectúa procesos curativos y preventivos preferiblemente con un fungicida sistémico.

- En bolsas llenas con un substrato compuesto por tres partes de suelo y una de arena y previamente desinfectado, se siembra cada propágulo en posición

inclinada, dejando el nudo tapado con el substrato. También en este proceso se puede utilizar un enraizador comercial.

- Los propágulos son sometidos a condiciones de 30ºC, humedad relativa de 75%, donde a los 40 días deben haber germinado el 95% de los sembrados. Sin invernadero los propágulos brotan a los 70 días de sembrados.

### 2.1.2. Las fases de desarrollo de un guadual

La regeneración vegetativa de *G. angustifolia* es dominante, abundante y agresiva y pasa las diferentes etapas de madurez en tiempos relativamente cortos. La guadua por ser una monocotiledónea no tiene cambium vascular, por lo que emerge con un diámetro definido cuyo crecimiento se expresa únicamente en altura y maduración de la madera. Se han identificado cinco estadios de desarrollo: a) rebrote o renuevo, b) juvenil (culmo color verde intenso), c) maduro (culmo color verde pálido, blancuzco por presencia de líquenes), d) sobremaduro (culmo color amarillento) y e) seco (tallo muerto) (Castaño 1987 citado por Londoño 1998; Giraldo & Sabogal, 1999; Castaño, 2002) Figura 33.

Renuevo

Juvenil

Maduro

Sobremaduro

Figura 33. Fases de desarrollo de un guadual.

El tiempo que dura un estadio vegetativo se denomina "tiempo de paso". Su conocimiento permite la estimación de la edad y del estado general del guadual para definir la intensidad y temporalidad de las intervenciones silviculturales (Castaño, 2002).

En ciclo de vida promedio es de 11 años aproximadamente. Esto varía de acuerdo a la calidad del sitio, sanidad general y del manejo silvicultural. La guadua alcanza su altura máxima en 6 meses (estado renuevo), pasa 1,5 años en estado juvenil, y de 8 a 9 años en estado maduro, aproximadamente un año en estado seco, hasta que muere. El ciclo de aprovechamiento es de tres años, desde la etapa de renuevo hasta la maduración óptima de la madera lista para el corte. (Castaño 2002)

La siguiente descripción de los estadios de desarrollo fue tomado de Castaño, (1987, 2002) (citado por Londoño, 1998), Giraldo & Sabogal, (1999).

#### 2.1.2.1. Renuevo

Una vez formado el rizoma se inicia la fase de renuevo, cuando la parte apical del rizoma emerge con un diámetro definido para formar un tallo o culmo nuevo (Figura 33). Esta es la primera etapa en la fase del desarrollo asexual o vegetativo, que dura hasta que este alcanza su altura máxima. Los nudos siembre están protegidos por brácteas o hojas culmonares y no desarrollan ramas o follaje. Este estadio dura entre 6 a 7 meses.

El crecimiento longitudinal de los tallos empieza a manifestarse por la elongación completa y sucesiva de los entrenudos, comenzando por el inferior y finalizando por el más apical. Sólo se inicia la formación de un nuevo entrenudo cuando el inmediato anterior está definido. Una vez que el culmo alcanza su altura máxima inicia el estadio juvenil.

#### 2.1.2.2. Estadio juvenil

Puede ser reconocido por la pérdida de las hojas (brácteas) caulinares, por el color verde intenso del culmo, bandas nodales blanquecinas y por el desarrollo de ramas y follaje (Figura 33). La caída de las hojas caulinares, da paso a la salida de las ramas laterales primarias y secundarias que en la porción superior inician la emergencia a los 210-230 días. La formación del follaje se prolonga entre 230-250 días (7 a 8 meses).

La etapa juvenil se extiende por 6 a 24 meses, tiempo en el cual no logra obtener el grado de resistencia óptimo para su aprovechamiento dado su alto contenido de humedad.

#### 2.1.2.3. Estadio maduro

El culmo pierde su color verde brillante, se torna verde opaco y gradualmente gris debido la colonización de líquenes, hongos y mohos. Este estadio inicia a 1,5 años hasta cinco años o más cuando grandes cantidades de líquenes, hongos y mohos colonizan los entrenudos (Figura 33). Esta fase es óptima para el aprovechamiento (Londoño *et al.,* 1998)

Según Giraldo & Sabogal (1999), a los 2,5 años desaparece el lustre de los entrenudos, su coloración se vuelve más clara y aparecen colonias de hongos en forma de manchas redondeadas a oblongas de color gris claro. La madera esta totalmente lignificada y su resistencia es óptima. Una vez que los hongos y líquenes comienzan a desaparecer del tallo, se inicia la decoloración hasta que el tallo se torna amarillento. Este es fin del ciclo vegetativo.

#### 2.1.2.4. Estadio sobremaduro y seco

Este es el estadio en que la planta muere. El tallo se torna amarillento con manchas rojizas, posteriormente se seca. El tiempo de este estadio es de 5 a 7 años (Londoño *et al.,* 1998; Giraldo y Sabogal 1999).

### 2.1.3. Bancos de germoplasma

Los bancos de germoplasma en el continente americano crecieron considerablemente desde la década de los setenta cuando se originaron las primeras iniciativas globales de conservación de material genético. Las cifras de materiales conservados reportadas en las bases de datos de WIEWS y de SINGER así lo indican. Salvo algunos bancos de importancia mundial, poco sabemos de la diversidad real que conservan los bancos de la región, del flujo de germoplasma y la disponibilidad de estos materiales para el mejoramiento genético (Franco, 2008).

Las primeras iniciativas de conservación de los recursos fitogenéticos a nivel mundial se gestaron como resultado de las primeras dos Conferencias Internacionales sobre Recursos Fitogenéticos promovidas por la FAO (1967, 1973). En ellas se exhortó a los

interesados en los recursos fitogenéticos a establecer una red mundial de bancos de germoplasma (Plucknett *et al.,* 1987). El International Board for Plant Genetic Resources (conocido después como International Plant Genetic Resources Institute –IPGRI- y más recientemente como Bioversity International), establecido en 1974, asumió la responsabilidad de catalizar y coordinar estas iniciativas mundiales para colectar y conservar germoplasma. Como consecuencia de estos esfuerzos, desde mediados de la década de los setenta, se estableció la mayoría de bancos nacionales de germoplasma en la región americana. Sin embargo, en algunos países ya existían bancos antes de esta década; tal es el caso del banco nacional del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA-CENIAP) de Venezuela y el National Seed Storage Laboratory de los Estados Unidos. Los países de América Latina, apoyados por la FAO y Bioversity International, se unieron a estos esfuerzos internacionales realizando colectas de germoplasma y estableciendo jardines botánicos y bancos de germoplasma nacionales. El interés generado por estas primeras actividades propició el desarrollo y la utilización de tecnologías de conservación, como la conservación *in vitro*, la criopreservación y la biotecnología (Franco, 2008).

En Asia existen diversas colecciones de bambúes y bancos de germoplasma, sin embargo en América, son pocas y se ubican en Jardines Botánicos o Centros de Investigación. Sobresalen el Tropical Research Institution en Puerto Rico, el Instituto Agronómico de Campinas, en Brasil, el Jardín Botánico de Cienfuegos en Cuba, la Estación Experimental de Pichilingue en Ecuador, la colección en Pucalpa, Perú y el Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan Maria Céspedes en Tuluá (Muñoz *et al.*, 2008).

Se sabe que los recursos genéticos son la base para el mejoramiento de las especies. Este se puede encontrar en su hábitat natural, en jardines botánicos, o en los campos de cultivo, y se puede conservar *in situ* o *ex situ* (Rao, 2000).

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 de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes se ha especializado en el género Guadua, y ha contribuido a asegurar la diversidad genética nativa.

Según Judziewicz *et al*. (1999), "el único banco en el continente americano de germoplasma de guadua, se estableció en el Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá, de propiedad del Instituto Vallecaucano de Investigaciones Científicas – INCIVA en 1988". Esta colección establecida hace ya 24 años (1987-2011) mediante el proyecto Colciencias-Inciva No. 2108-07-009-85 reúne 45 accesiones de *G. angustifolia* provenientes de 16 departamentos de Colombia. Además reúne otras especies del género como por ejemplo *G. amplexifolia* Presl, y *G. weberbaueri* Pilger y nuevas especies descritas como *G. uncinata*, Londoño & Clark y *G. macrospiculata*, Londoño & Clark (Londoño & Clark, 2002).

Ante la necesidad de replicar esta colección y gracias al interés expresado por la Corporación Autónoma Regional del Quindío, en el año de 1989 se estableció una colección de bambúes en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-guadua ubicado en el Municipio de Córdoba, a 1240 metros sobre el nivel del mar. Posteriormente en el 2002, esta colección se incrementa y hoy día cuenta con un total de 37 accesiones que representan 11 géneros, 27 especies, 6 variedades y 2 especies sin identificar (Londoño, 2002).

También en el Jardín Botánico San Jorge de Ibagué, se montó una colección de Bambusoideae con el fin de que se convierta en un atractivo científico y turístico y de que contribuya a fortalecer la conservación y el manejo sostenible de los bambúes en Colombia, y a mejorar la variabilidad genética del material a propagarse. Como resultado de este proyecto, se enriquece la base genética del Jardín Botánico San Jorge en un total de 44 accesiones, que representan nueve géneros y 22 especies (Londoño, 2003).

A parte de estos esfuerzos de colecciones de bambúes *ex situ*, se han realizado algunos estudios taxonómicos y morfológicos sobre la especie *G. angustifolia* reconociéndose para Colombia tres variedades: *G. angustifolia* var. Angustifolia Kunth, *G. angustifolia* var. Bicolor Londoño y *G. angustifolia* var. Nigra Londoño (Londoño, 1989; Londoño & Clark, 1998).

*G. angustifolia* var. Angustifolia Kunth

*G. angustifolia* var. Bicolor Londoño

*G. angustifolia* var. Nigra Londoño

Figura 34. Tres variedades de *G. angustifolia* descritas para Colombia.

## 2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.2.1. Área de estudio

#### 2.2.1.1. Área de estudio de los materiales superiores.

Los materiales superiores fueron seleccionados en diferentes fincas del Eje Cafetero, a partir del proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de

*Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia". En la Tabla 15, y la Figura 35, se puede observar la ubicación de estas fincas.

Tabla 15. Ubicación geográfica de los materiales superiores de guadua en el Eje Cafetero.

| | FINCA | MUNICIPIO | DEPARTAMENTO | ALTURA | BIOTIPO |
|---|---|---|---|---|---|
| **1** | El Bambusal "A" | Montenegro | QUINDÍO | 1254 | Castilla |
| **2** | Nápoles "C" | Montenegro | QUINDÍO | 1250 | Cotuda |
| **3** | Nápoles "D" | Montenegro | QUINDÍO | 1247 | Macana |
| **4** | Nápoles "E" | Montenegro | QUINDÍO | 1223 | Nigra |
| **5** | La Secreta "H" | Circasia | QUINDÍO | 1616 | Macana |
| **6** | La Mejorana "M" | Quimbaya | QUINDÍO | 1420 | Macana |
| **7** | El Naranjal "W" | Chinchiná | CALDAS | 1318 | Macana |
| **8** | El Nogal "Z" | Palestina | CALDAS | 1318 | Cebolla |
| **9** | Villa Martha "Alfa" | Pereira | RISARALDA | 1320 | Macana |

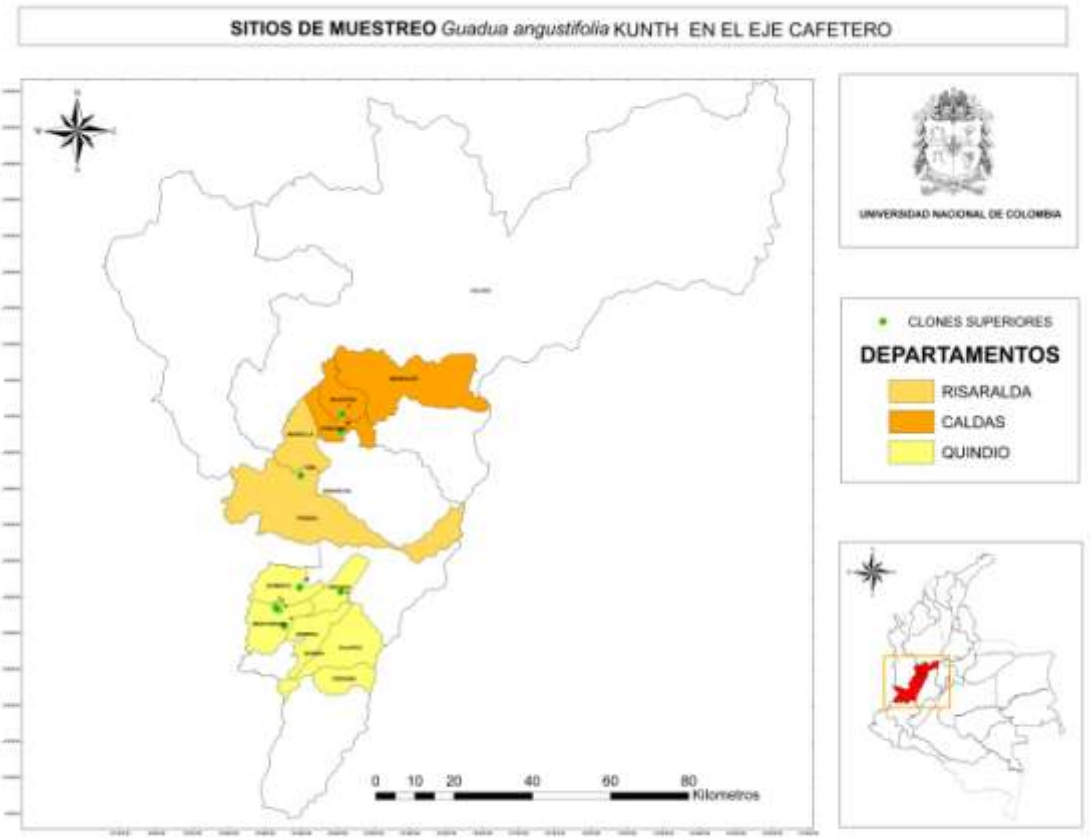



Figura 35. Distribución geográfica de los materiales superiores de guadua en el Eje Cafetero.

### 2.2.1.2. Área de estudio del duplicado del Banco de Germoplasma del Jardín Botánico Juan María Céspedes

Se colectaron 56 accesiones de guadua del Banco de Germoplasma de Bambús del Jardín Botánico Juan María Céspedes, ubicado en el corregimiento de Mateguadua, a 7 km del área urbana de Tuluá. Tiene una extensión de 154 hectáreas de terrenos ondulados, con alturas que oscilan entre los 1.050 y 1.300 metros sobre el nivel del mar. La temperatura promedio es de 25 ºC, y la precipitación pluvial promedia unos 1.000 mm anuales, con dos períodos trimestrales de lluvias alternados con dos de sequía. Está ubicado dentro de la zona de vida denominada Bosque Seco Tropical (B.S.T). Es propiedad del INCIVA (Instituto para la Investigación y la Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca), de la Gobernación del Valle de Cauca.

### 2.2.2. Fases de trabajo

#### 2.2.2.1. Colecta de materiales

Se realizaron colectas de chusquines de los materiales seleccionados y de los duplicados de guadua del Jardín Botánico de Tuluá. Estos materiales fueron trasladados a Palmira en donde se evaluó la adaptación y desarrollo. Una vez alcanzaron la etapa adecuada se inició el proceso de reproducción masiva de estos materiales.

Para obtener los chusquines se debió recorrer el guadual buscando las plántulas más sanas y vigorosas. Se separaron del rizoma madre o del suelo utilizando un palín bien afilado, teniendo en cuenta que siempre tuvieran una cantidad de suelo alrededor de las raíces y que hubiera más de tres tallitos por chusquín. Una vez se sacaron del guadual se transportaron con cuidado dentro de una bolsa o estopa libre de agentes patógenos al sitio donde se iban a sembrar.

#### 2.2.2.2. Establecimiento en vivero

Los chusquines de los materiales superiores traídos al vivero de la Universidad Nacional de Colombia fueron plantados en bolsas plásticas de 20 cm ancho x 20 cm de altura y con fuelle. Cada material fue marcado con la letra del sitio de colecta y el número de accesión.

Para los materiales del Jardín Botánico se utilizaron bolsas de 50 x 50cm, puesto que en el momento de la colecta no todos los materiales tenían chusquines y se tuvo que colectar rizomas para su multiplicación.

El sustrato utilizado para la siembra de las accesiones fue compuesto de tres partes de cachaza compostada, dos partes de cascarilla de arroz, una parte de carbonilla.

Al sembrar el chusquín en la bolsa, el suelo quedó bien apretado alrededor de las raíces, para evitar que se formaran vacíos en la bolsa, los cuales contribuyen a la pudrición de la raíz y de la planta. Se realizaron riegos periódicos cada dos a tres días y se fertilizaron con un abono orgánico rico en nitrógeno.

Los materiales fueron evaluados periódicamente y se hizo una matriz teniendo en cuenta el número de brotes, número de rebrotes nuevos y emisión de follaje. Estos datos se analizaron bajo un diseño completamente al azar con medidas repetidas en el tiempo, se utilizó el programa SAS (versión 2003) para el análisis estadístico. Se realizó la prueba de promedios de Duncan.

#### 2.2.2.3. Establecimiento en campo

Luego de la multiplicación inicial de los chusquines en el vivero de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, fueron llevados a un vivero en el Eje Cafetero en Montenegro

(Quindío). Posteriormente serán establecidos en cuatro ensayos de rendimiento diferentes sitios representativos de la eco-región cafetera para evaluar el rendimiento de los materiales superiores en campo durante diez años.

Los duplicados del banco de germoplasma se establecieron en campo en inmediaciones de la Hacienda el Paraíso, a una distancia de siembra de 8 x 8m entre plantas.

#### 2.2.2.4. Elaboración de planos

Se elaboraron mediante el uso del software ArcGis 9.3.1, los planos correspondientes al banco de germoplasma de bambúes del Jardín Botánico de Tuluá y al lote de siembra de los duplicados de este en la Hacienda El Paraíso.

## 2.3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 2.3.1. Materiales superiores

Se colectaron 64 chusquines en total, dependiendo de la presencia de estos en cada guadual, obteniendo entre cinco y once de cada material superior. Estos materiales fueron transportados y establecidos en bolsas en el vivero de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

iva.

Figura 37. Establecimiento en vivero de los materiales superiores.

El sustrato utilizado para esta siembra dio muy buenos resultados, puesto que a las tres semanas ya se estaban observando rebrotes nuevos. (Figura 41)

Figura 38. Brotes nuevos de los materiales en vivero.

Después de plantados los chusquines se realizaron evaluaciones periódicas, teniendo en cuenta la emisión de brotes, emisión de rebrotes nuevos y emisión de follaje, con estas variables análisis de covarianza por medio el programa estadístico SAS versión 2003, donde se tubo en cuenta el número de brotes en la ultima evaluación y en la primera.

De acuerdo a los resultados consignados en la Tabla 16, para la variable No. de Brotes se observaron diferencias significativas ($P<0.001$) entre sitios. Conforme a la Prueba de Promedios de Duncan (Tabla 17.), el mayor No. de Brotes se observo en los sitios A y E (5.0 y 4.5 brotes respectivamente), seguido por los sitios M y D (3.7 y 3.5 brotes respectivamente).

Tabla 16. Análisis de varianza para la variable N° de brotes.

| Fuente de Variación | Gli | No. de Brotes | |
|---|---|---|---|
| | | CM | Pr > F |
| **SITIO** | **5** | 0.01145 | <.0001 |
| **DIA** | **6** | 0.00284 | 0.001 |
| **SITIO x DIA** | **30** | 0.00016 | 1.000 |
| **Promedio** | | **3.0** | |
| **CV (%)** | | **3.27** | |

Tabla 17. Prueba de Duncan para la variable de respuesta N° de brotes.

| Sitio | Número de brotes | |
|---|---|---|
| | Promedio | Grupo |
| **A** | 5,0 | a |
| **E** | 4,6 | ab |
| **M** | 3,7 | b |
| **D** | 3,5 | b |
| **H** | 2,1 | c |
| **Z** | 1,4 | c |

Nota: Dentro de una misma columna, promedios con igual letra no difieren estadísticamente.

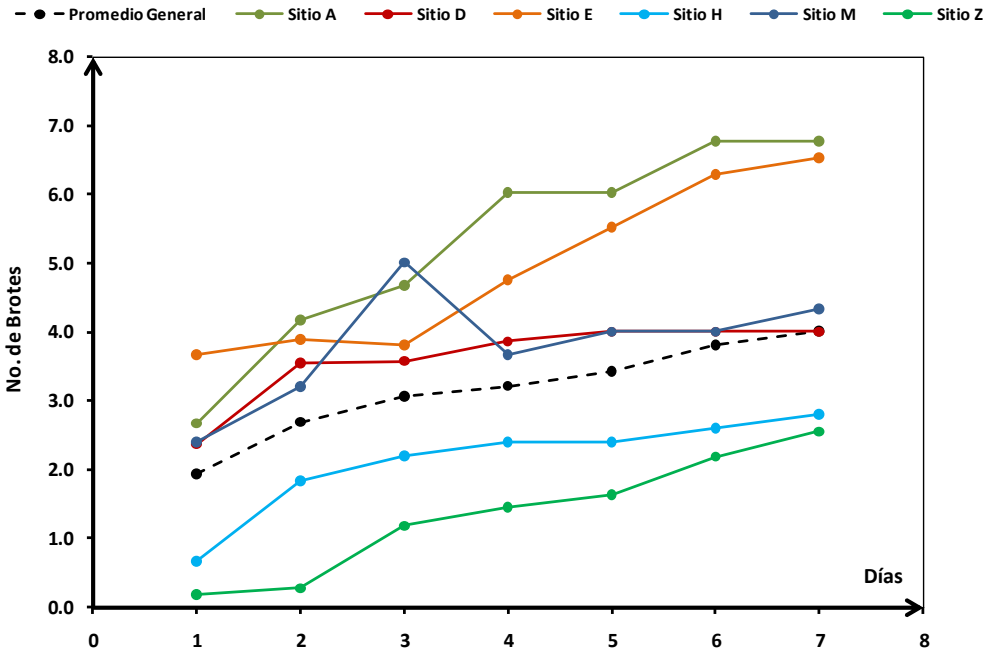



Figura 39. Comportamiento de los materiales en el tiempo de acuerdo a la procedencia.

Respecto al promedio general (Figura 39) se observa que los materiales provenientes del los Sitios A y E presentaron una mayor producción de brotes en el tiempo, alcanzando un máximo de 7 brotes a los 7 días de evaluación. Los materiales de los sitios H y Z presentaron un número de brotes por debajo del promedio general, con un máximo de dos brotes a los 7 días.

Los materiales superiores después de evaluados en el vivero de la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira fueron trasladados a otro vivero en el Eje Cafetero (Figura 40) para su establecimiento en cuatro sitios representativos de la eco-región cafetera, en cuatro ensayos de rendimiento (Figura 41), donde se evaluará la dinámica de producción de brotes de las guaduas durante 7 – 10 años.

Figura 40. Establecimiento en vivero del Eje Cafetero de los materiales superiores de *G. angustifolia.*

Figura 41. Ensayo de rendimiento con los materiales superiores de *G. angustifolia* en el Municipio de Montenegro, Quindío.

### 2.3.2. Duplicados del Jardín Botánico Juan María Céspedes

Se colectaron 38 individuos de las accesiones de guadua del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá (Tabla 18), fueron trasladadas al invernadero de la Universidad Nacional sede Palmira para evaluar su vigor con la emisión de brotes, rebrotes y follaje.

Tabla 18. Accesiones del Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes, Mateguadua, Tuluá.

| Código | Especie | Procedencia |
|---|---|---|
| **076 XL** | *Guadua angustifolia* | Sasaima - Cundinamarca |
| **091 XL** | *Guadua angustifolia* | San Agustín - Huila |
| **109 XL** | *Guadua uncinata* | Morelia - Caquetá |
| **144 XL** | *Guadua incana* | Florencia - Caqueta |
| **206 XL** | *Guadua angustifolia* | Puerto Caicedo - Putumayo |
| **214 XL** | *Guadua incana* | Mocoa - Putumayo |
| **233 XL** | *Guadua angustifolia* | Ricaute - Nariño |
| **235 XL** | *Guadua angustifolia* | Ricaute Nariño |
| **281 XL** | *Guadua* aff. *angustifolia* | Acacias - Meta |
| **282 XL** | *Guadua venezuelae* | Serranía de Matupa - Meta |
| **289 XL** | *Guadua angustifolia* | San Juan de Arama - Meta |
| **291 XL** | *Guadua* aff. *angustifolia* | Río Guejar - Meta |
| **303 XL** | *Guadua angustifolia* | Cumaral - Meta |
| **343 XL** | *Guadua angustifolia* | Puente Nacional - Santander |
| **344 XL** | *Guadua angustifolia* | Curiti - Santander |
| **345 XL** | *Guadua angustifolia* | Bucarica - Santander |
| **366 XL** | *Guadua aff. angustifolia* | Encizo - Santander |
| **391 XL** | *Guadua angustifolia* | Samaniego - Nariño |
| **399 XL** | *Guadua angustifolia* | Abejorral – Antioquia |
| **413 XL** | *Guadua amplexifolia* | Cáceres - Antioquia |
| **418 XL** | *Guadua angustifolia* | Valparaíso - Antioquia |
| **580 XL** | *Guadua weberbaueri* | Amacayacu - Amazonas |
| **1003 JA** | *Guadua amplexifolia* | Montería - Córdoba |
| **1004 JA** | *Guadua* aff. *amplexifolia* | Sincelejo - Sucre |
| **1006 JA** | *Guadua amplexifolia* | Costa Atlántica |
| **1012 JA** | *Guadua angustifolia* | Venecia - Antioquia |
| **1013 JA** | *Guadua angustifolia* | Bolombolo - Antioquia |
| **1016 JA** | *Guadua angustifolia* | Cañasgordas - Antioquia |
| **1019 JA** | *Guadua angustifolia* | Mutatá - Antioquia |
| **1020 JA** | *Guadua angustifolia* | Anzá - Antioquia |
| **1023 JA** | *Guadua angustifolia* | El Cairo - Valle |
| **1026 JA** | *Guadua angustifolia* | Aipe - Huila |
| **1027 JA** | *Guadua angustifolia* | San Juan de Rioseco - |
| **1028 JA** | *Guadua angustifolia* | Cundinamarca |
| **1029 JA** | *Guadua angustifolia* | Ríonegro - Antioquia |
| **1031 JA** | *Guadua angustifolia* | Florencia - Caldas |
| **s.n XL** | *G. angustifolia* var. *bicolor* | Puente Zinc, Tulúa - Valle |
| **NN s.c.** | *Guadua aff. angustifolia* | sin localidad |

XL: Ximena Londoño – JA; Juan Adarve

Estos duplicados se sembraron en un lote cedido por el INCIVA (Instituto para la Investigación y la Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca), de la Gobernación del Valle. (Figura 42)

Figura 42. Siembra de duplicados del Banco de Germoplasma de Bambúes del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá.

Cada duplicado se sembró a 8m de distancia entre planta y se marco con una lamina de alumnio, donde se especifica el código de la accesión y la fecha de siembra.

### 2.3.3. Elaboración de planos

Usando del software ArcGis 9.3.1, se elaboraron los planos correspondientes al banco de germoplasma de bambúes del Jardín Botánico de Tuluá (Figura 43) y al lote de siembra de los duplicados en la Hacienda El Paraíso (Figura 44).

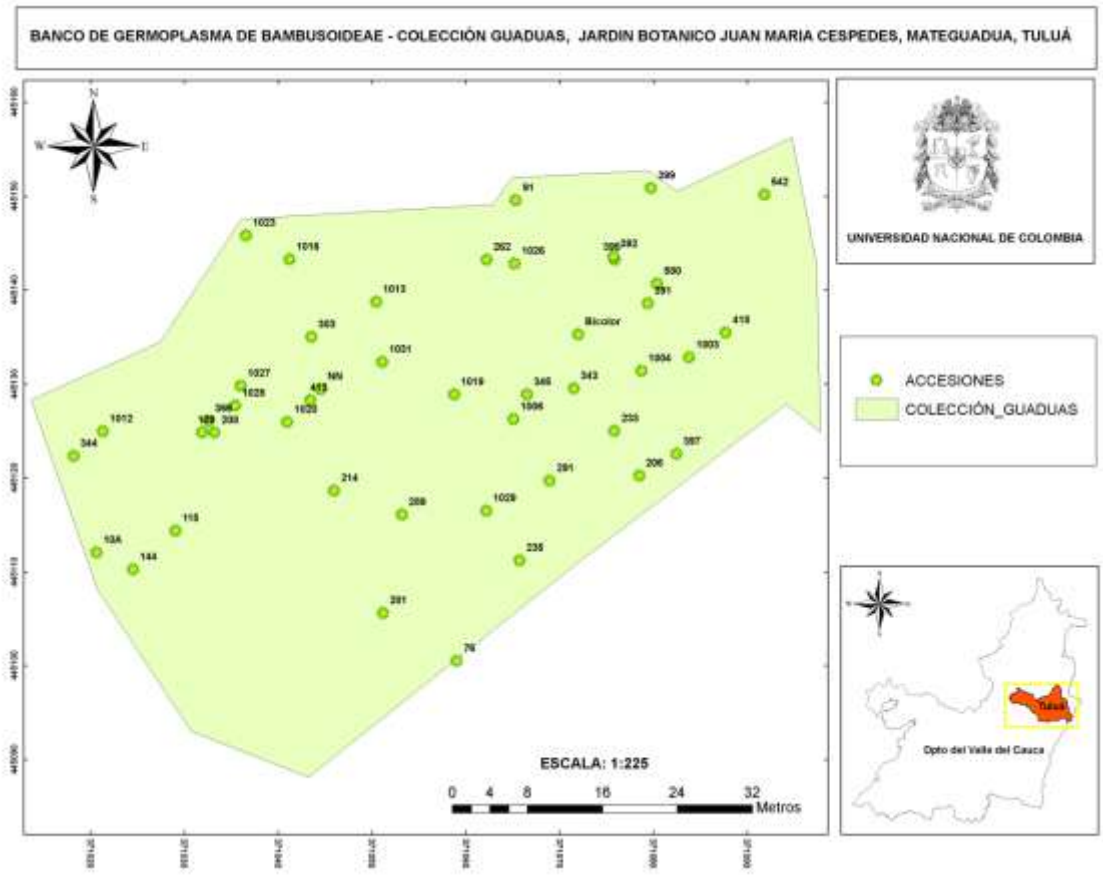



Figura 43. Plano del banco de germoplasma de bambúes del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá, Valle del Cauca.

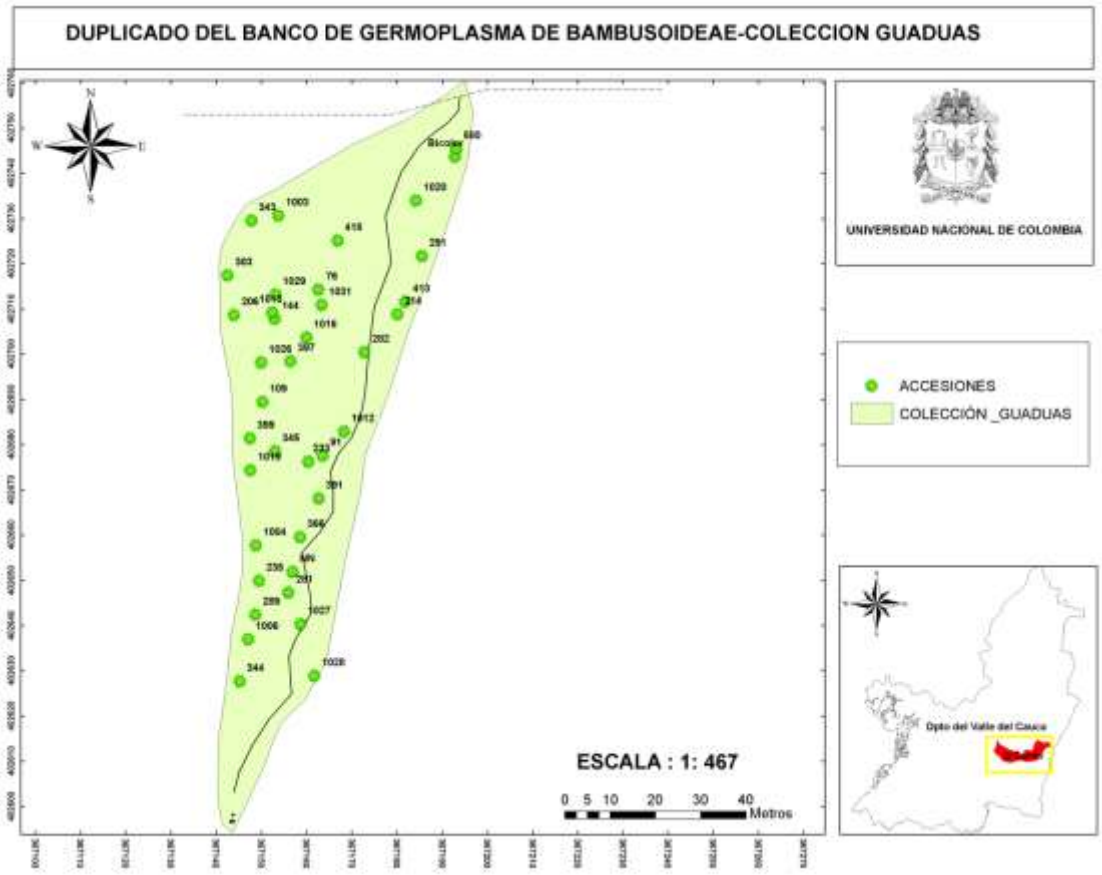



Figura 44. Plano del lote de siembra de los duplicados del banco de germoplasma del Jardín Botánico de Tuluá en La Hacienda EL Paraíso, Cerrito – Valle del Cauca.

## 2.4. CONCLUSIONES

- El establecimiento del duplicado del banco de germoplasma del género *Guadua* permitirá disponer de material vegetal para su conservación y utilización en futuros trabajos de investigación, además, contribuye a salvaguardar la diversidad genética del recurso.

- La implementación de ensayos de rendimiento en cuatro ambientes de la eco-región del Eje Cafetero permitirá evaluar los materiales en iguales condiciones ambientales, con lo cual se puede hacer estimaciones de adaptabilidad y estabilidad.
  .

## BIBLIOGRAFÍA


ARIAS, L. M., HOYOS, D. P. 2004. Cuantificación del contenido de carbono en suelos bajo rodales de *Guadua angustifolia* Kunth en el Eje Cafetero de Colombia, y estrategias de manejo para su conservación como beneficio ambiental. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira. 100 p.

CASTAÑO, F. 1987. Sistemas silviculturales para la propagación y manejo de la guadua en Colombia. Revista técnica Corporación Autónoma del Valle del Cauca 1:35-41.

CASTAÑO, F. 2002. Definición técnica de un régimen de aprovechamiento de bosques de guadua (*Guadua angustifolia* Kunth), y su incidencia en la sostenibilidad, sanidad y rentabilidad del recurso. Experiencias en el Departamento del Valle del Cauca, Colombia. Mayo 16-17, Seminario-Taller: Avances en la investigación sobre guadua. Pereira, Colombia. p. 1-10.

CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DEL QUINDÍO. (CRQ). centro nacional para el estudio del bambú guadua. http//www.crq.gov.co/visual_crq/pagina11centroguadua.html

FAO. 1973. Technical Conference on Crop Genetic Resources [Rome, 12- 16 marzo 1973]. Rome, IT, Plant Production and Protection Division. Disponible en http://www.faoorg/docrep/006/85704E/85704E02.htm#ch2. 1.

FAO/IBP. 1967. Technical Conference on the Exploration, Utilization and Conservation of Plant Genetic Resources [Rome, 18-26 September 1967]. Rome, IT, Plant Production and Protection Division. Disponible en http://www.fao.org/docrep/006/85704E/85704E02.htm#ch2. 1.

FRANCO, T. 2008. Los bancos de germoplasma en las Américas. En: Recursos naturales y ambiente. Nº 53. Pp 81 - 84.

GILLET, H. & WALTER, K. 1998. 1997 IUCN Red List of Threatened Plants. IUCN–The World Conservation Union, Gland, Switzerland.

GIRALDO, E., & A. SABOGAL. 1999. Una alternativa sostenible: La Guadua. una alternativa sostenible Corporación Autónoma Regional del Quindío-CRQ.

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

HILTON-TAYLOR, C. (compiler) 2000. 2000 IUCN Red List of Threatened Species. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

INIA (Instituto de Investigaciones Agropecuarias). 2006. Boletín No. 156. Santiago, Chile.

JUDZIEWICZ, E.J., CLARK, L.G., LONDOÑO, X. and Stern, M.J. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington DC, USA.

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. & L.G. CLARK. 1998. Eight new taxa and two new reports of Bambuseae (Poaceae: Bambusoideae) from Colombia. Novon (8): 408-428

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

LONDOÑO, X. 1998. A decade of observations of a *Guadua angustifolia* plantations in Colombia. En: The Journal of the American Bamboo Society, Vol. 12 (1), p. 37-42.

LONDOÑO, X. 2001. La Guadua un bambú importante de América. En Memorias cebador Seminario Bamboo, Guayaquil, Ecuador, 8-10 de agosto.

LONDOÑO, X. 2002. Caracterización, manejo y ampliación del germoplasma de Bambusoideae del Centro Nacional para el Estudio del Bambú – Guadua, Córdoba, Quindío. Informe Final presentado a la Corporación Autónoma Regional del Quindío. Pp.30.

LONDOÑO, X. 2003. Clasificación taxonómica, ampliación y manejo de la colección de Bambúes del Jardín Botánico San Jorge, Ibagué, Colombia. Informe Final presentado a la Corporación Autónoma Regional del Tolima. Pp.13.

MUÑOZ, J. E., & LONDOÑO, X. 2008. Proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el Eje Cafetero de Colombia”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira.

NELSON, B.W. 1994. Natural forest disturbance and change in the Brazilian Amazon. Remote Sensing Reviews (10): 105-125.

NIETO, F. 1985. Propagación y manejo de *Bambusa guadua* en Colombia. *In* Actas de los simposios sobre técnicas de producción de leña en fincas pequeñas, y recuperación de sitios degradados por medio de la silvicultura intensiva. Salazar, R. Editor. 24 al 28 de Junio, 1985. CATIE/FAO/MAB. Turrialba, Costa Rica. p. 279-286

OSPINA, R; FINEGAN, B. 2004. Variabilidad florística y estructural de los bosques dominados por *Guadua angustifolia* en el Eje Cafetero colombiano. Recursos Naturales y Ambiente (41): 25-33.

PEREA, J., VILLEGAS, J. P., CERQUERA, Y., & CORTES, M. 2003. Evaluación y documentación de prácticas sobresalientes sobre el manejo de la cosecha y maduración de la guadua en el departamento del Huila. Ministerio de Agricultura y desarrollo Rural y la Fundación para el desarrollo de la ingeniería.

PLUCKNETT, D., SMITH, N., WILLIAMS, J. & ANISHETTY, N. 1987. Genebanks and the world's food. Princeton, NJ, Princeton University Press.

RAO, R. 2000. Strategies for collecting bamboo germplasm. *En* Rao, A.N. & V.R. Rao, editors. Bamboo – Conservation, Diversity, Ecogeography, Germplasm, Resource Utilization and Taxonomy.

RODRÍGUEZ, J. A; SEPÚLVEDA, I. C. 2004. Beneficios ambientales en la disminución de la erosión y la capacidad de almacenamiento de agua en los suelos bajo rodales de guadua, en el Eje Cafetero Colombiano. Trabajo de grado. Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Tecnológica de Pereira.

SADEGHIAN, S., MURGUEITIO, E. & RIVERA, J. M. 1999. Características de Suelos en Sistemas Agropecuarios y Forestales para el Ordenamiento Territorial en el Departamento del Quindío (Colombia).

## ANEXOS

### Anexo A. Protocolo de dellaporta (modificado) para extracción de ADN

1. Preparar baño María a 65ºC y colocar el Buffer de Extracción.
2. Marcar dos juegos de tubos Eppendorf de 1.5 ml**.**
3. Macerar 30 – 40 mg de tejido foliar joven pero maduro en nitrógeno líquido.
4. Transferir el tejido a un tubo de 1.5 ml con espátula.
5. Adicionar 800µl de Buffer de extracción y 50µl de SDS al 20% ó 100µl al 10%.
6. Mezclar bien el tejido usando vortex o una punta
7. Incubar a 65ºC por 15 minutos, invirtiendo periódicamente.
8. Incubar a temperatura ambiente por 2 minutos.
9. Adicionar 250µl de Acetato de Potasio 5M frío (-20ºC) y mezclar.
10. Incubar en hielo 20 minutos en agitación en Shaker.
11. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos
12. Transferir 750µl del sobrenadante a un tubo nuevo.
13. Adicionar 640µl de Isopropanol frío y mezclar 8 – 10 veces
14. Incubar a -80ºC por 1 hora o a -20ºC por 2 horas o una noche.
15. Centrifugar a 12.000 rpm por 10 minutos.
16. Remover el Isopropanol y secar las gotas con toallas.
17. Poner a secar en cámara extractora de gases.
18. Agregar 80µl de TE 1X con una pipeta de 100µl.
19. Adiciona 1µl RNAsa
20. Hacer un corto Spin en vortex

Guardar a -4ºC (**no más de un mes a esta Temperatura)**

**Anexo B. Protocolo de dellaporta con fenol: cloroformo: alcohol isoamílico para extracción de ADN**

- Coloque 50 mg de tejido liofilizado y molido en un tubo de 1,5 o 2 ml.
- Agregue 800 ul de solución amortiguadora CTAB. Mezcle por inversión, para homogenizar el tejido con la solución amortiguadora.
- Incube y mueva los tubos con suavidad en un agitador de balance en un baño a 65º C durante 90 min.
- Retire los tubos los tubos del horno y deje enfriar durante 5 a 10 min.
- Agregue 500 ul de FCI (Fenol cloroformo isoamilico 25:24:1) agite los tubos por inversión durante 10 min a temperatura ambiente.
- Centrifugue a 13500 rpm a temperatura ambiente durante 5 min. para formar la parte acuosa (liquido claro de color amarillo) y la fase orgánica (de color verde oscuro)
- Recupere aproximadamente 750 ul de la fase superior acuosa y vacíela en un tubo nuevo de 1.5 o 2.0 ml.
- Agregar 500 ul CI (Cloroformo isoamilico 24:1) agitar 5 min. Centrifugar 5 min a 13500 rpm. Recuperar la fase acuosa en un tubo nuevo.
- Agregue ½ volumen de isopropanol (2-propanol) al 100% previamente enfriado en un refrigerados a -20 ºC. Mezcle por inversiòn para favorecer la precipitación de ADN. Incube las muestras toda la noche a -20ºC.
- Centrifugue a 13500 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. para precipitar y formar la pastilla de ADN en el fondo del tubo. Deseche el isopropanol por decantación.
- Agregue 1 ml de alcohol al 75% lave suavemente la pastilla de ADN. Centrifugue a 13500 por 1 min. Deseche el alcohol por decantación. Deje q se evapore a temperatura ambiente hasta que la pastilla seque. Si todavía siente olor a alcohol, esto indica que la pastilla no esta completamente seca.
- Vuelva a suspender la pastilla en 100 ul de TE o agua doble destilada. Guarde las muestras a 4ºC hasta utilizarlas; si no va utilizarlas mucho tiempo, almacénelas a -20ºC.

**Solución amortiguadora con CTAB para extracción**1

| | | **1 RXN** | **5 RXN** | **10 RXN** | **20 RXN** | **50 RXN** | **60 RXN** |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **SOL. CONC. [FINAL]** | | **10 ml** | **50 ml** | **100 ml** | **200 ml** | **500 ml** | **600 ml** |
| dH2O | | 6.5 ml | 32.5 ml | 65.0 ml | 130.0 ml | 325.0 ml | 390.0 ml |
| 1 M Tris-7.5 | 100 mM | 1.0 ml | 5.0 mL | 10.0 ml | 20.0 ml | 50.0 ml | 60.0 ml |
| 5 M NaCl | 700 mM | 1.4 ml | 7.0 ml | 14.0 ml | 28.0 ml | 70.0 ml | 84.0 ml |
| 0.5 M EDTA-8.0 | 50 mM | 1.0 ml | 5.0 ml | 10.0 ml | 20.0 ml | 50.0 ml | 60.0 ml |
| CTAB2 | 1 % | 0.1 g | 0.5 g | 1.0 g | 2.0 g | 5.0 g | 6.0 g |
| 14 M BME3 | 140 mM | 0.1 ml | 0.5 ml | 1.0 ml | 2.0 ml | 5.0 ml | 6.0 ml |

1 Utilice la solución recién hecha; calentar a 60-65 □C antes de agregar CTAB y BME.
2 CTAB = bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio (Sigma M-7635).
3 Agregar BME (□-mercaptoetanol) bajo una campana extractora, justo antes de usarse.

| Reactivo | [ ] Final | 10 ml | 50 ml | 100 ml | 200 ml | 500 ml | 600 ml |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **Agua** | | 6.5 ml | 32.5 ml | 65.0 ml | 130 ml | 325 ml | 390 ml |
| **Tris 1M** | 100 mM | 1 ml | 5 ml | 10 ml | 20 ml | 50 ml | 60 ml |
| **NaCl 5M** | 700 mM | 1.4 ml | 7 ml | 14 ml | 28 ml | 70 ml | 84 ml |
| **EDTA 0,5 M** | 50 mM | 1.0 ml | 5 ml | 10 ml | 20 ml | 50 ml | 60 ml |
| **CTAB** | 1% | 0.1 gr | 0.5 gr | 1 gr | 2 gr | 5 gr | 6 gr |
| **BME** | 140 mM | 0.1 ml | 0.5 ml | 1 ml | 2 | 5 ml | 6 ml |

**Anexo C. Prueba Exacta (Raymond and Rusell, 1995)**

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9999 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9999 | 1,0000 | 0,9995 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8 | 1,0000 | 0,9997 | 0,9990 | 1,0000 | 0,9996 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | | |
| 10 | 1,0000 | 0,9961 | 1,0000 | 0,9960 | 1,0000 | 0,9999 | 1,0000 | 0,9983 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | | |
| 11 | 1,0000 | 0,9997 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | | |
| 12 | 1,0000 | 0,9991 | 0,9999 | 1,0000 | 0,9993 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | | |
| 13 | 1,0000 | 0,9915 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9997 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9997 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | | |
| 14 | 0,9998 | 0,9369 | 0,9988 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9997 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | | |
| 15 | 1,0000 | 0,9970 | 0,9999 | 1,0000 | 0,9999 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9999 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | | |
| 16 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | | |
| 17 | 1,0000 | 0,9999 | 0,9999 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | | |
| 18 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9999 | 0,9779 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9989 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9980 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | | |
| 19 | 1,0000 | 0,9816 | 0,9998 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | | |
| 20 | 1,0000 | 0,7878 | 0,9911 | 1,0000 | 0,9999 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9997 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | ***** | | | |
| 21 | 1,0000 | 0,9978 | 0,9989 | 0,4354 | 0,9997 | 0,9995 | 0,4736 | 0,9910 | 0,8062 | 0,9904 | 0,9172 | 0,6179 | 0,1458 | 0,6445 | 0,9956 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9995 | ***** | | |
| 22 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9988 | 1,0000 | 0,9999 | 0,9999 | 0,9992 | 0,9998 | 1,0000 | 0,9998 | 0,9995 | 0,9895 | 0,9999 | 0,9804 | 1,0000 | 0,9996 | 1,0000 | 0,9815 | 0,9255 | 1,0000 | ***** | |
| 23 | 0,9998 | 0,9668 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9998 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9977 | 1,0000 | 1,0000 | 0,9727 | 0,9889 | ***** | |

**Anexo D. Matriz de datos obtenida mediante el análisis de patrones de bandas con seis marcadores moleculares RAMs en 45 muestras de los materiales superiores de Guadua angustifolia Kunth.**

| Banda | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | D1 | D2 | D3 | D4 | D5 | E1 | E2 | E3 | E4 | E5 | H1 | H2 | H3 | H4 | H5 | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | W1 | W2 | W3 | W4 | W5 | Z1 | Z2 | Z3 | Z4 | Z5 | α1 | α2 | α3 | α4 | α5 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **1** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **2** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **3** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **4** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **5** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **6** | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **7** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **8** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **9** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **10** | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **11** | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **12** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **13** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **14** | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **15** | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **16** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **17** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **18** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **19** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **20** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **21** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **22** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **23** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **24** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **25** | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **26** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **27** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **28** | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **29** | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **30** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **31** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **32** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **33** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **34** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **35** | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **36** | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **37** | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **38** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **39** | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **40** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **41** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **42** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **43** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **44** | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **45** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **46** | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **47** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **48** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **49** | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **50** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **51** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **52** | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **53** | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **54** | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **55** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **56** | 1 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **57** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **58** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **59** | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **60** | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **61** | 1 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **62** | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **63** | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **64** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **65** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **66** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **67** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **68** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **69** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **70** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **71** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **72** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **73** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **74** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **75** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **76** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **77** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **78** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **79** | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **80** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **81** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **82** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **83** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **84** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **85** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **86** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **87** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **88** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **89** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **90** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **91** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **92** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **93** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **94** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **95** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **96** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **97** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **98** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **99** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **100** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **101** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **102** | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **10** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |

| | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **3** | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| **104** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **105** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **106** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **107** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **108** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **109** | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **110** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **111** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **112** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **113** | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| **114** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **115** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| **116** | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |