

Análisis de diversidad genética mediante microsatélites (SSR) en cultivares del germoplasma cubano de yuca

Yoel Beovides^{1*}, Martin Fregene², Alfredo Alves³, Janneth P. Gutiérrez², Charles Buitrago², Jaime A. Marin², Marilys D. Milián¹, Sergio Rodríguez¹, José A. Cruz¹, Elianet Ruiz¹, Dablys Guerra¹, Humberto Toledo¹, Omayra Roca¹, Julia Albert¹, Jesús García¹, María Oliva¹. *Autor para correspondencia.

¹Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT), Apdo. 6, Santo Domingo. CP 53 000, Villa Clara, Cuba. e-mail: yoelbeovides@yahoo.es

²Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Colombia.

³Cassava Biotechnology Network (CBN).

RESUMEN

Se realizó un estudio con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la diversidad genética de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), y para evaluar sus relaciones filogenéticas con parientes cultivados de África, Sur y Centroamérica, con vistas a garantizar un manejo sostenible de los recursos genéticos de que dispone Cuba. Se estudiaron 94 cultivares pertenecientes a la Colección Cubana de Yuca de acuerdo con su importancia económica y genética, además, se incorporaron 54 clones procedentes de África y América y otros 13 genotipos de interés genético. Los análisis de diversidad y diferenciación genética fueron desarrollados a partir de los datos de 34 marcadores microsatélites (SSR). Los índices de diversidad genética evidenciaron el alto polimorfismo observado para los microsatélites ensayados, el material vegetal procedente de Cuba mostró el mayor número promedio de alelos por loci con 5.8 y al igual que Guatemala presentó el 100% de los loci polimórficos; Cuba y Tanzania presentan los mayores índices de heterocigocidad media observada (Ho). La proporción promedio de individuos heterocigotos observados (Ho) fue alta (0.5918 ± 0.0351). Estos resultados, alcanzados por primera vez en Cuba en yuca, son importantes para su programa de mejoramiento genético y para el manejo sostenible de la diversidad genética en Cuba y en la región del Caribe.

Palabras clave: diferenciación genética, *Manihot*, marcadores, polimorfismo, relaciones filogenéticas

ABSTRACT

A study was carried out in order to make a deep analysis of the current knowledges cassava (*Manihot esculenta* Crantz) genetic diversity, and to evaluate its phylogenetic relationship with relatives cultivated in Africa, and South and Central America in order to facilitate a sustainable management of the genetic resources available in Cuba. A number of 94 cultivars from the Cuban cassava germplasm were studied according to their genetic or economic importance; besides, 54 clones from Africa and America, and 13 genotypes of genetic interest were incorporated. Diversity and genetic differentiation analysis were developed from data of 34 microsatellite markers (SSR). Genetic diversity indexes evidenced the high polymorphism observed for the tested microsatellites. The plant material, coming from Cuba, showed the highest allele average number per locus with 5.8 and as Guatemala, it illustrated 100% polymorphic loci. The highest mean heterozygosity indexes (Ho) are presented by Cuba and Tanzania. The mean rate of heterozygous individuals observed (Ho) was high (0.5918 ± 0.0351). These results reported in Cuba for the first time in cassava, offer an important contribution to the genetic breeding program and to the sustainable management of the cassava genetic diversity in Cuba and in the Caribbean area.

Key words: genetic differentiation, *Manihot*, markers, polymorphism, phylogenetic relationship

INTRODUCCIÓN

Para facilitar la explotación y conservación de las colecciones de germoplasma, se hace necesario mantener una constante profundización en el entendimiento de la diversidad genética dentro de ellas, así como de la naturaleza de las relaciones genéticas existentes entre cada una de los genotipos que la conforman (He *et al.*, 1995).

En el caso de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz), con el desarrollo de la biología molecular, diversos

marcadores moleculares han sido utilizados exitosamente en el estudio de cultivares procedentes de diferentes regiones y países (Fregene *et al.*, 1997; Fregene *et al.*, 2003).

La novedosa técnica de microsatélites o de Secuencias Simples Repetidas (SSR) resulta atractiva para estudiar debido a su abundancia en el genoma vegetal, su alto polimorfismo y adaptabilidad a la automatización, y a su vez, ha resultado adecuada para la caracterización de germoplasma de yuca (Dixon *et al.*, 2002; Azudia *et al.*, 2002).

Aunque en Cuba dicha técnica no ha sido explotada con esa finalidad, la existencia de una amplia Colección de Germoplasma de *Manihot esculenta* Crantz con un rico patrimonio genético (Milián *et al.*, 2000), su alto valor en la alimentación de los cubanos y la importancia de profundizar en el conocimiento de este acervo de genes en función de potenciar su conservación y explotación sostenible, así como la necesidad de establecer relaciones entre estas accesiones y sus parientes cultivados, justifican la realización de continuas investigaciones donde pueda ser incluida.

Por tanto, el presente estudio tuvo como objetivo profundizar en el conocimiento de la diversidad genética del cultivo en Cuba y evaluar sus relaciones filogenéticas con parientes cultivados de África, Centro y Suramérica, con vistas a garantizar el manejo sostenible de los recursos de que se dispone y como contribución al programa internacional de mejoramiento genético de la yuca.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Un total de 94 cultivares de acuerdo con su importancia económica y genética, fueron colectados en la Colección Cubana de Yuca, custodiada por el Instituto de Investigaciones en Viandas Tropicales (INIVIT, Cuba). Además se incorporaron 54 clones procedentes de África y América (12 de Nigeria, 10 de Tanzania, 12 de Guatemala y 20 de Suramérica) y otros 13 genotipos de interés genético recomendados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT, Colombia).

Extracción del ácido desoxirribonucleico (ADN) y microsatélites (SSR)

El ADN total de los clones cubanos se obtuvo por el método de Dellaporta *et al.* (1983), en el caso del resto de las accesiones estudiadas este fue cedido gentilmente por el Programa de Genética de Yuca del CIAT; su concentración y calidad se evaluó por fluorimetría y por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, respectivamente. Diluciones a una concentración final de 10 ng.µl⁻¹ fueron usadas para los análisis de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por su sigla del inglés *Polimerase Chain Reaction*). Se evaluaron 36 marcadores SSR que representan una amplia cobertura del genoma de yuca (Fregene *et al.*, 1997), elegidos por su patrón claro de bandeo y robustez en varios estudios de diversidad y seleccionados de un conjunto desarrollados en CIAT por Mba *et al.* (2001).

El coctel para el PCR se preparó como sigue: 50 ng de ADN, 0.2 mM de dNTPs, 2.5 ml de solución amortiguadora 10X, 2 mM de MgCl₂, 1.25 mM cebador R, 1.25 mM cebador F, 1U de ADN polimerasa Taq.

y H₂O (calidad HPLC) hasta volumen final de 25 ml. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador PTC-100, utilizando el programa YUCADIV (con algunas variaciones según las condiciones específicas de cada microsatélite) que contiene los siguientes pasos: 1) 94 °C por 1 min, 2) 94°C por 30 seg 3) 55°C por 1 min. 4) 72°C por 2 min, 5) Desde el paso 2, se repite 29 veces, 6) 72 °C por 5 min, 7) queda a 4 °C durante tiempo indeterminado. Los productos de la amplificación fueron desnaturalizados y corridos a 100 watt en geles de poliacrilamida al 4%, usando un secuenciador automático ABI modelo 377 (Pelkin Elmer Inc.). Para el revelado se empleó la tinción con nitrato de plata según Fregene *et al.* (2002). La información de cada gel fue obtenida usando el paquete GENESCAN de ABI PRISM para Windows y el software GENOTYPER (Pelkin Elmer Inc.).

Los datos obtenidos (número de bandas, presencia o ausencia y peso de las bandas) fueron exportados a Microsoft Excel (Microsoft Inc.) y como peso de bandas para los análisis estadísticos correspondientes. Se utilizó un modelo de herencia estrictamente dialélico, por lo que las accesiones que mostraron tres o más alelos no fueron tomadas en cuenta (Fregene *et al.*, 2003). Los marcadores monomórficos fueron excluidos del análisis final.

Estimación de la diversidad y diferenciación genética

Los análisis de diversidad y diferenciación genética fueron desarrollados a partir de los datos de 34 marcadores SSR, seleccionados por su naturaleza dialélica, patrones bien definidos y amplia cobertura del genoma de yuca.

La lectura de las bandas y la determinación de su peso se realizó con el programa *Quantity one* (Bio-Rad. Inc). Las distancias genéticas basadas en la proporción de alelos compartidos (Bowcock *et al.*, 1994) fueron estimadas con la ayuda del programa MICROSAT (Minch, 1996). La matriz de distancias fue sujeta a un análisis de componentes principales (ACP) con el fin de obtener una estructura de las relaciones entre las accesiones usando el programa JMP (SAS Institute, 1995).

Los parámetros de diversidad genética y diferenciación fueron calculados mediante los paquetes estadísticos GENSURVEY (Vekemans *et al.*, 1997) y FSTAT (Goudet, 1990), respectivamente. La diversidad genética dentro de las accesiones fue estimada usando los siguientes estadísticos: porcentaje de locus polimórficos, número promedio de alelos por locus polimórfico, heterocigocidad promedio observada (Ho), y la diversidad genética promedio (He) (Nei, 1978). Dado el pequeño tiempo de divergencia evolutiva para las accesiones, el

modelo de alelos infinitos (MAI) (Kimura y Crow, 1964) fue asumido para todos los cálculos.

La diferenciación genética fue estimada por el estadístico F_{ST} (*theta*) (Wright, 1951) descrito por Weir y Cockerman (1984), con ayuda del software FSTAT (Goudet, 1995) y por el estadístico G_{ST} (Nei, 1978). Los estadísticos-F (F_{ST} , F_{IS} e F_{IT}) fueron estimados por alelo, por locus y en total. FSTAT realiza *bootstrapping* sobre loci y dado el gran número de loci no ligados empleados en este estudio, provee de rigurosas pruebas para las hipótesis de diferenciación genética. Intervalos de confianza fueron calculados por locus sobre muestras y sobre loci por *jackknifing* (200 replicaciones) y por *bootstrapping* (1000 *bootstrapping*) sobre loci. Se diseñó una matriz de comparación entre países con los valores de F_{ST} con la ayuda de FSTAT (Goudet, 1995) y la relación fue analizada por un análisis de *cluster*, usando el método UPGMA de NTSYS-PC (Rohlf, 1993).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De un total de 36 microsatélites (SSR) evaluados, dos resultaron monomórficos (SSRY-127 y SSRY-132), mientras que en el resto de los oligonucleótidos se pudo apreciar un alto nivel de amplificación y de polimorfismo para los 142 genotipos de yuca (*Manihot esculenta* Crantz) estudiados en cinco grupos de diferente origen

geográfico: Cuba, Guatemala, Colombia, Nigeria y Tanzania.

El número de alelos observado en cada locus fluctúa entre dos y diez. Se encontraron 17 alelos únicos con baja frecuencia de aparición (en todos los casos menores al 25 %) en las accesiones cubanas, en 12 de los 34 marcadores polimórficos evaluados: SSRY 4 (0.04), SSRY 20 (0.006), SSRY 38 (0.005), SSRY 59 (0.006 y 0.079), SSRY 63 (0.033), SSRY 69 (0.023), SSRY 100 (0.011), SSRY 103 (0.052, 0.012, 0.012 y 0.006), SSRY135 (0.005), SSRY 151 (0.05), SSRY 171 (0.012 y 0.036) y SSRY 177 (0.014). También se encontraron alelos únicos en los genotipos de Colombia (6), Nigeria (3), Tanzania (3) y Guatemala (1).

Estimación de diversidad y diferenciación genética

Los índices de diversidad genética (Tabla 1) evidencian el alto polimorfismo observado para los microsatélites ensayados, Cuba muestra el mayor número promedio de alelos por loci con 5.8 y al igual que Guatemala presenta el 100% de los loci polimórficos. Cuba y Tanzania presentaron los mayores índices de heterocigocidad media observada (H_o), la heterocigocidad media esperada (H_e) fue de 0.6292 ± 0.0120 (corregida para tamaños de muestra pequeños de acuerdo con Nei, 1978).

Tabla 1. Diversidad genética dentro de grupos de cultivares de yuca tradicionalmente cultivada, clasificada de acuerdo con su país de origen. Desviación estándar estimada por *jackknifing* sobre loci (200 replicaciones). H_s , H_o , D_{st} y G_{st} están dados sobre loci y sobre grupos (países).

Población	n	#loc	#loc_P	PLP	K	K_P	HO_p	HE_p	HEc_p
CUBA	86	34	34	100.0	5.8	5.8	0.6016	0.6314	0.6351
GUATEMALA	10	34	34	100.0	4.2	4.2	0.5556	0.6063	0.6385
COLOMBIA	11	34	33	97.1	4.5	4.6	0.5675	0.6087	0.6396
NIGERIA	16	34	33	97.1	4.5	4.6	0.5885	0.5949	0.6136
TANZANIA	10	34	31	91.2	4.2	4.5	0.6459	0.5869	0.6190
Media	5 Poblaciones			97.06	4.64	4.72	0.5918	0.6057	0.6292
Desv. estándar				3.60	0.65	0.61	0.0351	0.0169	0.0120

	Ht	Hs	Dst	Gst
Media	0.6538	0.6057	0.0482	0.0740
Desv. estándar	0.1770	0.1682	0.0253	0.0377
95% CI	0.5780	0.5341	0.0383	0.0618
95% CI	0.7137	0.6663	0.0585	0.0878

Leyenda: n: Número medio de individuos, #loc: Número de loci, #loc_P: Número de loci polimórficos, PLP: Porcentaje de loci polimórficos, K: Número medio de alelos por locus, K_P: Número medio de alelos por locus polimórfico, HO_p: Heterocigocidad media observada, HE_p: Heterocigocidad media esperada, HEc_p: Heterocigocidad media esperada corregida para tamaños de muestra pequeños (Nei, 1978), Ht: Diversidad genética total, Hs: Diversidad genética promedio dentro de las poblaciones, Dst: Diversidad genética promedio entre poblaciones, Gst: Coeficiente de diferenciación genética.

Esto indica que, probablemente, la condición de isla ha provocado un proceso de diferenciación típico en los clones cubanos que les confieren características peculiares distintivas, y confirman la idea de un proceso de diferenciación entre materiales Africanos y Latinoamericanos, con una subestructura más pronunciada en las poblaciones Africanas (Fregene *et al.*, 2000; 2003).

La proporción promedio de individuos heterocigotos observados (H_o) fue alta (0.5918 ± 0.0351). Los estimadores de diversidad genética H_e y H_o de la yuca cultivada tradicionalmente en Latinoamérica no fueron significativamente diferentes a los de África, lo que revela un nivel comparable de polimorfismo en Cuba respecto al encontrado en las otras poblaciones estudiadas. Resulta interesante que aunque la heterocigocidad total (H_t) fue alta (0.6538 ± 0.1770), sólo un 7.4 % de ésta se debe a diferenciación entre accesiones, el resto se debe a variaciones entre países (H_s).

Al evaluar la diferenciación genética cuando se realizaron estimaciones de comparación de valores F_{st} (*theta*) sobre todos los loci entre los países para evaluar el intercambio de material genético; todos los valores fueron superiores a 0.4 y comparables entre sí, el valor más alto se alcanzó entre Colombia y Tanzania (0.605), seguido de Guatemala y Colombia (0.561) y por Nigeria y Tanzania (0.560).

En el dendograma (UPGMA) de la comparación del índice de fijación (F_{ST}) entre genotipos de yuca cultivada de Cuba, Nigeria, Colombia, Guatemala y Tanzania se pudo observar la cercanía genética existente entre los clones cubanos, nigerianos y colombianos.

Al analizar las relaciones genéticas entre accesiones de diferente origen geográfico, la figura 1 muestra la distribución de las accesiones a partir del cálculo de las distancias genéticas basado en la proporción de alelos compartidos (PAC) y estimados como 1-PAC. Este es el estimador más apropiado cuando se usan datos de microsatélites, asumiendo el modelo de alelos infinitos (MAI) (Kimura y Crow, 1964) y cuando las relaciones son estrechas (Bertin *et al.*, 2000).

Al evaluar la diferenciación genética cuando se realizaron estimaciones de comparación de valores F_{st} (*theta*) sobre todos los loci entre los países para evaluar el intercambio de material genético; todos los valores fueron superiores a 0.4 y comparables entre sí, el valor más alto se alcanzó entre Colombia y Tanzania (0.605), seguido de Guatemala y Colombia (0.561) y por Nigeria y Tanzania (0.560).

En el dendograma (UPGMA) de la comparación del índice de fijación (F_{ST}) entre genotipos de yuca cultivada de Cuba, Nigeria, Colombia, Guatemala y Tanzania se pudo observar la cercanía genética existente entre los clones cubanos, nigerianos y colombianos.

Al analizar las relaciones genéticas entre accesiones de diferente origen geográfico, la figura 1 muestra la distribución de las accesiones a partir del cálculo de las distancias genéticas basado en la proporción de alelos compartidos (PAC) y estimados como 1-PAC. Este es el estimador más apropiado cuando se usan datos de microsatélites, asumiendo el modelo de alelos infinitos (MAI) (Kimura y Crow, 1964) y cuando las relaciones son estrechas (Bertin *et al.*, 2000).

PCA CON LOS GENOTIPOS DE LAS CINCO POBLACIONES ESTUDIADAS

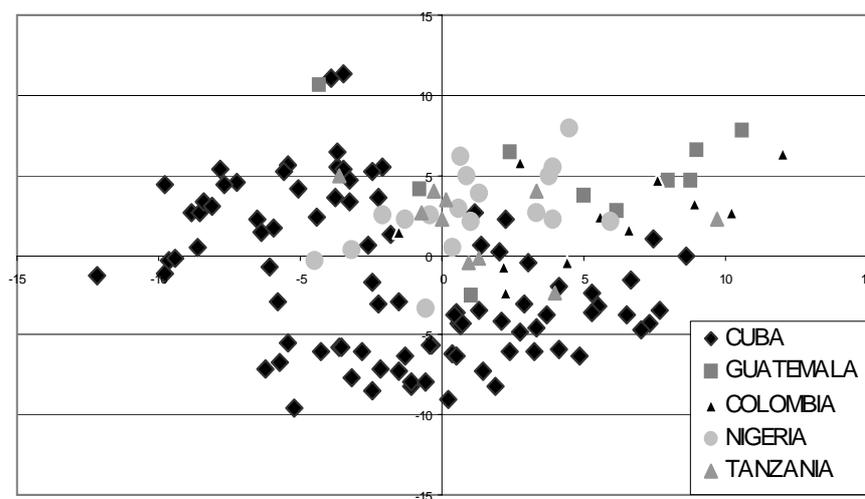


Figura 1. Análisis de Componentes Principales (ACP) basado en la distancia 1-Proporción de Alelos Compartidos (1-PAC), entre accesiones de yuca de Cuba, Colombia, Guatemala, Nigeria y Tanzania.

La representación gráfica de las relaciones genéticas entre las accesiones se obtuvo gracias a un análisis de componentes principales (ACP) apoyado en la matriz de distancias genéticas, donde los dos primeros componentes explican el mayor porcentaje de la variación total.

El ACP representa gráficamente las relaciones entre accesiones de diferente origen geográfico con la particularidad de que el mayor número de accesiones le corresponde a Cuba, el resto de los genotipos representan una estructura propia previamente estudiada por otros autores en su ACP correspondiente (Castelblanco, 2003; Fregene *et al.*, 2003) y en la que se insertaron los genotipos cubanos.

Resulta interesante la tendencia de los clones cubanos a formar dos grupos y a presentar genotipos en posiciones particulares y alejadas de esos grupos. Igualmente sugerente se muestra la estrecha relación de algunos clones cubanos con dos genotipos de Guatemala y Tanzania en el cuarto cuadrante. Se sabe que la yuca guatemalteca, por estar en uno de los centros de origen, posee características muy peculiares y de interés genético (Castelblanco *et al.*, 2004; Monte *et al.*, 2004). En cuanto a los países africanos, tienen un punto de contacto con la yuca cultivada en Cuba, luego de muchos años de coincidencia en programas de mejoramiento con sede en el CIAT (Colombia), desde donde llegan cada año nuevos clones que evalúan los productores cubanos (Rodríguez *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta el comportamiento de los genotipos provenientes de Cuba en comparación con el resto de los países africanos y latinoamericanos estudiados, se realizó un análisis de componentes principales (ACP) para evaluar la variación genética dentro de la población cubana de yuca estudiada. Pudo apreciarse que existe una amplia variabilidad entre las accesiones, aunque se formaron dos grupos bien definidos; algunos clones se alejan de esa estructura, debido a que en la mayoría de los casos se trata de materiales vegetales con características muy peculiares dentro del germoplasma cubano de yuca. Sobre estos aspectos deberá profundizarse en estudios futuros.

Los resultados encontrados en Cuba se corresponden con características peculiares de este germoplasma cultivado durante muchos años (desde los aborígenes) en el ambiente insular (Borda, 1975; Rodríguez *et al.*, 2000), lo que ha generado diferenciación de esta población respecto a las que se encuentran en los continentes, independientemente de que se confirma el entrecruzamiento y la alta heterocigocidad presentes en la yuca antes expuesto.

La estrecha relación entre los clones cubanos y de ellos con el resto de los genotipos estudiados pudiera

estar vinculado al propio proceso de extensión de la yuca por el mundo, hecho que se produce casi sobre los mismos criterios de selección de los productores lo cual los hace parecerse mucho entre sí. A su vez, muchos de los clones tienen un origen común o emparentado a través del programa de mejoramiento genético establecido en CIAT y que vincula diversos países y regiones.

Estos resultados se obtienen por primera vez en Cuba y la ubican dentro del selecto grupo de países que ha utilizado esta técnica para profundizar en el conocimiento de la diversidad genética presente en colecciones de germoplasma de yuca, lo cual es de incalculable valor científico y estratégico para desarrollar el programa nacional de fitomejoramiento del cultivo. También facilitaría el intercambio de germoplasma y incorpora una contribución concreta para su protección y uso sostenible.

De manera general, los análisis moleculares mostrados en este trabajo se realizan por primera vez con genotipos cubanos, colectados en diferentes zonas del país y significan aportes científicos importantes para perfeccionar las estrategias de conservación y utilización de los recursos genéticos custodiados en la colección cubana de yuca durante casi 40 años.

CONCLUSIONES

Los clones cubanos de yuca estudiados mediante microsatélites, muestran una alta diferenciación genética entre ellos y aunque su diversidad es alta, evidencian sus relaciones de parentesco con los genotipos cultivados de África, Centro y Suramérica.

Se confirmó que los genotipos cultivados de yuca muestran mayores diferencias dentro de las poblaciones que entre ellas, debido al propio proceso evolutivo del cultivo desde sus centros de origen.

REFERENCIAS

- Azudia C, Monte L, Debouck D, Fregene M (2002) Simple Sequence Repeat (SSR) Marker Assessment of Genetic Diversity of Cassava Land Races from Guatemala. Annual Report-2002, Project IP3: Improved cassava for the developing world. Output 8-17, CIAT, Cali.
- Baverstock PR, Moritz C (1996) Project design. En: Hillis DM, Moritz C y Mable BK (eds) Molecular systematics, pp. 17-27. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Bowcock, AM, A Ruiz-Linares, J Tomfohrde, E Minch, JR Kidd LL Cavalli-Sforza (1994) High resolution of human evolution, with polymorphic microsatellites. Nature 368: 455 – 457
- Castelblanco, W, Fregene M, Perea M (2004) Diversidad y diferenciación genética de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) con marcadores microsatélites en poblaciones de África y Latinoamérica. Acta Biológica Colombiana 9(2): s/p.
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JR (1983) A plant DNA miniprep: version II. Plant Mol Biol Rep 1:19-21

- Dixon A, Raji A, Marin J, Fregene MA (2002) Simple Sequence Repeat (SSR) Marker Assessment of Genetic Diversity of Cassava Land Races from Nigeria. Annual Report-2002, Project IP3: Improved cassava for the developing world. Output 8-12. CIAT, Cali, Colombia
- Fregene M, Angel F, Gómez R, Rodríguez F, Chavarriaga P, Roca W, Tohme J, Bonierbale M (1997) A molecular genetic map of cassava. *Theor. Appl. Genet.* 95: 431-441
- Fregene M, Suárez M, Mkumbira J, Kulembeka H, Ndedya E, Kulaya A, Mitchel S, Gullberg U, Dixon AGO, Dean R, Kresovich S (2003) Simple sequence repeats marker diversity in cassava landraces: genetic diversity and differentiation in an asexually propagated crop. *Theor. Appl. Genet.* 107(7):1083-1093
- Fregene MA, Bernal A, Duque MC, Dixon AGO, Thome J (2000) AFLP analysis of African cassava (*Manihot esculenta* Crantz) germplasm resistant to the cassava mosaic disease (CMD). *Theor. Appl. Genet.* 100:678-685
- Goudert J (1995) FSTAT (ver. 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J Hered* 86:485-486
- He, G, Prakash CS, Jarret RL (1995) Analysis of genetic diversity in a sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) Lam.) germplasm collection using DNA amplification fingerprinting. *Genome* 38: 938-945
- Kimura M, Crow JT (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49:725-738
- Mba REC, Stephenson P, Edwards K, Melzer S, Mkumbira J, Gullberg U, Apel K, Gale M, Tohme J, Fregene MA (2001) Simple Sequence Repeat (SSR) Markers Survey of the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) Genome: Towards an SSR-Based Molecular Genetic Map of Cassava. *Theor. and Appl. Genet.* 102: 21-31
- Minch E (1996) MICROSAT. Version 1.4. Stanford University Medical Centre, Stanford, USA. <http://lotka.stanford.edu/microsat/microsat.html>
- Monte, L, Azudia CD, Buitrago RC, Debouck DG, Tohme MJ, Fregene MA (2004) Simple sequence repeat (SSR) assessment of genetic diversity of local cassava varieties from Guatemala. En: International Scientific Meeting of the Cassava Biotechnology Network (6, 2004, Cali, Colombia). Abstracts: Adding value to a small-farmer crop. p.162. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia
- Nei M (1978) Estimation of average heterozygosity and genetics distances from a small number of individuals. *Genetics* 89:583-590
- Olsen K, Schaal B (2001) Microsatellite variation in cassava *Manihot esculenta*, *Euphorbiaceae* and its wild relatives: evidence for a southern amazonian origin of domestication. *Am. J. Bot.* 88:1033-1040
- Rohlf DJ (1993) NTSYS-PC numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.8 Exeter Publ., Setauket, New York
- SAS Institute, Inc (1995) JMP (version 3.1). Cary, North Caroline
- Rodríguez, S, Folgueras M, Medero V, García M, Pons C, González DL, Molina O (2000) Desarrollo del cultivo de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Cuba. Reunión Anual de CLAYUCA (Consortio Latinoamericano de la Yuca), Colombia, Agosto/2000, 12 p.
- Vekemans X, Lefevre C (1997) On the evolution of heavy metal tolerant populations in *Armeria maritima*: evidence from allozyme variation and reproductive barriers. *J. Evol. Biol.* 10:175-199
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370
- Wright S (1951) The genetic structure of populations. *Ann. Eugen.* 15: 323-354