

UNIVERSIDAD CENTRAL DEL ECUADOR

FACULTAD DE FILOSOFÍA, LETRAS Y CIENCIAS DE LA EDUCACIÓN

ESCUELA DE BIOLOGÍA

**CUANTIFICACIÓN DE LA EROSIÓN GENÉTICA DE
MELLOCO (*Ullucus tuberosus* Caldas), OCA (*Oxalis tuberosa*
Mol.) Y MASHUA (*Tropaeolum tuberosum* R. y P.) EN
AGROECOSISTEMAS DE LAS PROVINCIAS DE CAÑAR,
CHIMBORAZO Y TUNGURAHUA, ECUADOR**

Tesis de Grado previa a la obtención del título de Doctor en Biología

Autor: Lic. Raúl Fernando Pozo Zapata

Director: Dr. Jesús Inca

Quito, marzo del 2000

RESUMEN

Ante la observación de claras evidencias de pérdida de variabilidad en tres tubérculos andinos *Ullucus tuberosus* (melloco), *Oxalis tuberosa* (oca) y *Tropaeolum tuberosum* (mashua), por efecto de factores como sequías, introducción de variedades mejoradas, cambios en los hábitos alimenticios y aspectos socioeconómicos (migración, asentamientos humanos, expansión de la frontera agrícola, deforestación, etc.), se desarrolló un estudio piloto que tuvo como objetivo determinar cualitativa y cuantitativamente el grado de erosión genética en dichos cultivos. Para ello, se desarrolló una caracterización morfológica y molecular de estas especies, aplicándose paralelamente encuestas agro-socioeconómicas en comunidades de las provincias de Cañar, Chimborazo y Tungurahua.

El presente estudio incluyó una fase de campo y otra de laboratorio. Para la fase de campo se recolectaron tubérculos de melloco, oca y mashua que se identificaron con el código *CEG* (cuantificación de erosión genética); y, se analizaron comparativamente con accesiones con código *ECU* conservadas *ex situ* desde 1978 por el Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF), teniendo como parámetros comparativos los descriptores de color principal, color secundario y forma del tubérculo. Para ello, se empleó la información disponible en la base de datos electrónica *ECUCOL* y el Catálogo de Recursos Genéticos de Raíces y Tubérculos Andinos (Tapia *et al.*, 1996). Se aplicaron además encuestas agro-socioeconómicas a 64 agricultores (30 de Cañar, 24 de Chimborazo y 10 de Tungurahua) con el fin de confirmar o no la hipótesis de que en las comunidades en estudio en los últimos años no se ha perdido variabilidad en los tres tubérculos por efecto de diversos procesos de erosión genética.

Para el análisis estadístico de las encuestas se tomó en cuenta cuatro parámetros: agricultores que han dejado de sembrar sus cultivares, causas para el abandono del cultivo (falta de semillas en las zonas de producción, factores ambientales, etc.); morfotipos que se han dejado de sembrar; y, morfotipos que se han perdido de los sitios de recolección comparados con los que se encuentran descritos en la base de datos *ECUCOL*.

Es así que *Ullucus tuberosus* reflejó una disminución de la variabilidad con un promedio de 37,3%. Cañar fue la provincia con mayor erosión genética en este cultivo con un promedio de 44,4%. Para *Oxalis tuberosa* el promedio de erosión genética que se registra en la fase de campo fue de 33,26%, siendo Tungurahua la provincia que reportó el mayor porcentaje de pérdida de variabilidad alcanzando un promedio de 41,7%. Para *Tropaeolum tuberosum* se reportó un promedio de 46,5% de pérdida de variabilidad, y es la provincia de Cañar (con 61,1%) la que presentó mayor erosión en este tubérculo.

La segunda fase se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del DENAREF, empleando la técnica del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPDs), a fin de comparar las accesiones *ECU* y *CEG* en busca de polimorfismos que determinen similitudes o diferencias genéticas entre los materiales conservados en fincas de agricultores (a nivel *in situ*) y aquellos conservados en el banco de germoplasma (a nivel *ex situ*).

En este sentido, las tres especies fueron amplificadas por medio de *primers* de secuencia arbitraria (10 bases), de los cuales siete amplificaron productos polimórficos para melloco, 10 para oca y 12 para mashua. Estas amplificaciones dieron como resultado la generación de un mayor número de fragmentos polimórficos en las accesiones *CEG* (con respecto a sus homólogas *ECU*) en las tres especies, por lo cual es posible afirmar que se

han generado nuevos alelos RAPD por eventos como sustitución de nucleótidos, deleciones, inserciones, inversiones, etc. durante el lapso de tiempo transcurrido entre la colecta original y las realizadas para este estudio, pudiéndose desechar “fallas” o efectos de PCR como el apareamiento de bandas “fantasma”.

Las matrices binarias obtenidas del análisis molecular de melloco, oca y mashua se sometieron a un estudio de fenética por medio de las técnicas de *Neighbour-Joining* (NJ) y UPGMA empleando el coeficiente de *Jaccard*. Adicionalmente, se desarrolló un análisis filogenético mediante las técnicas de parsimonia, a fin de considerar el factor tiempo. Estas tres técnicas dieron como resultado dendrogramas que ubicaron a las accesiones *ECU* y *CEG* como erosionadas en la modalidad de similares, semidistantes o distantes genética y filogenéticamente.

Para la interpretación final de la fase de laboratorio se priorizó el trabajo con los resultados obtenidos por medio de la técnica de NJ, ya que ésta a más de establecer el análisis de distancias genéticas, incluye en su proceso el factor tiempo. En este contexto, melloco presentó seis accesiones que han sufrido erosión genética con respecto a las 28 *ECU* analizadas (lo que da un 21,4% de pérdida de variabilidad), siete entradas no erosionadas y 15 con flujo genético. En el caso de oca se reportaron 11 accesiones erosionadas de las 24 *ECU* analizadas (dando un porcentaje de 45,8% de pérdida de variabilidad), y 13 accesiones que han sufrido flujo genético, sin encontrarse accesiones no erosionadas. En mashua existieron 10 accesiones erosionadas de las 24 estudiadas (resultando un 43,4% de pérdida de variabilidad), dos accesiones no erosionadas y dos que han sufrido flujo genético.

En términos generales por especie, mashua alcanzó los niveles más altos de pérdida de variabilidad, con un 24,77% de promedio de erosión en las fases de campo y de laboratorio, tomando en cuenta la variabilidad total reportada en el Catálogo de Germoplasma de RTAs (Tapia *et al.*, 1996). En términos generales la provincia de Cañar reportó el mayor porcentaje de erosión en los tres tubérculos con un promedio de 46% en función de los datos proporcionados por los agricultores en las encuestas, caracterización morfológica y base de datos.

Finalmente, la detección de un mayor número de polimorfismos RAPD en las tres especies conservadas en fincas de agricultores (codificadas como *CEG*), en relación a los materiales conservados *ex situ* (*ECU*), confirma las teorías sobre la naturaleza de la conservación *in situ*: esta metodología permite la continuación de los procesos evolutivos bajo la acción de la selección natural y antropogénica, mecanismos responsables de crear y enriquecer la diversidad genética en los ecosistemas.

GENETIC EROSION QUANTIFICATION IN ULLUCUS (*Ullucus tuberosus* Caldas), OCA (*Oxalis tuberosa* Mol.) AND MASHUA (*Tropaeolum tuberosum* R.&P.) IN AGROECOSYSTEMS OF THE PROVINCES OF CAÑAR, CHIMBORAZO AND TUNGURAHUA - ECUADOR

SUMMARY

An alarming loss of genetic variability of three Andean tubers (*Ullucus tuberosus*, ullucus; *Oxalis tuberosa*, oca; and, *Tropaeolum tuberosum*, mashua) has been observed during the last few decades due to many factors such as the introduction of new varieties, droughts, changes in food habits, encroaching agriculture, deforestation and the migration from rural to urban areas. Thus, a pilot study was carried out to determine levels and rates of genetic erosion in these Andean crops by means of both morphological and molecular characterisations of these species, as well as a socioeconomical survey in highland communities from the provinces of Cañar, Chimborazo and Tungurahua.

The present study included a field and laboratory stage. For the field stage, tubers from the three species were collected and identified with the code *CEG* (=cuantificación erosión genética). The resulting germplasm was comparatively analysed with accessions conserved ex situ (coded *ECU*) since 1978 by the National Department of Plant Genetic Resources and Biotechnology (DENAREF); to this purpose, the descriptors tuber main colour, secondary colour and tuber shape were recorded. All available information included in the *ECUCOL* passport database and the Catalogue of Genetic Resources of Andean Root and Tuber Crops (Tapia *et al.*, 1996) was also used. Furthermore, information of a total of 64 socioeconomical questionnaires (30 in Cañar, 24 in Chimborazo and 10 in Tunguraha)

was compiled and analysed so as to confirm (or reject) the occurrence of genetic erosion in the three tuberous species.

For statistical analysis of the socioeconomic survey four parameters were taken into account: farmers no longer cultivating the species, reasons for abandoning the crop (lack of seed in production areas, environmental factors, etc.); morphotypes no longer cultivated; and, morphotypes that have been recently lost at the collecting localities compared with those described in the *ECUCOL* passport database.

Ullucus showed an average loss of variability of 37,3%. Regarding provinces, Cañar exhibited the highest level of genetic erosion with an average value of 44,4%. Oca accounted an average of 33,26%, being Tungurahua the province reaching the highest level of erosion (41,7%). An average value of 46,5% loss of variability was determined for mashua , with Cañar as the province revealing the highest percentage (61,1%).

The laboratory stage used the RAPD technique (Randomly Amplified Polymorphic DNA) to compare *ECU* and *CEG* accessions on the basis of molecular polymorphisms revealing genetic relationships between on farm-conserved materials and ex situ accessions from the germplasm bank. DNAs from the three species under study were amplified with primers of arbitrary sequence; of these, seven, 10 and 12 primers rendered polymorphic products for ullucus, oca and mashua, respectively. All DNA amplifications generated consistently a larger number of RAPD polymorphic fragments in the *CEG* accessions (compared to *ECU* materials) of the three species. Therefore, new RAPD alleles have been generated in the genomes under study (possibly due to nucleotide substitution, deletions, insertions, inversions, etc.) in the period of time elapsed between the original collecting and

the one carried for this study, discarding the occurrence of partial mismatching and PCR artifacts such as “ghost” bands.

The binary matrices obtained after molecular survey of the three species were phenetically analysed using both Neighbour-Joining (NJ) and UPGMA techniques with *Jaccard's* coefficient. In addition, a phylogenetic approach (parsimony) was used, taking into account time elapsed. These three methodologies generated dendrograms which classified *ECU* and *CEG* accessions of each crop as closely related, “semi”– related or distant genetically.

For final interpretation of the laboratory data, attention was focused on the results and dendrograms generated by the NJ technique since it considers analysis of genetic relatedness with different mutation rates along the plant genome (time elapsed). In this framework, ullucus showed six accessions (i.e. sensu morphotypes) which have undergone genetic erosion (21,4%, out of a total of 28 *ECU* materials), seven accessions with no genetic erosion occurrence and 15 accessions which have undergone germplasm flow (i.e. man-made dispersal from one community to another). Oca showed 11 accessions which have undergone erosion (45,8% out of a total of 24 *ECU* accessions) and 13 accessions with germplasm flow. Mashua exhibited 10 cases of genetic erosion (43,4% out of 24 accessions studied), whereas two accessions displayed no erosion and two cases were recorded as germplasm flow.

In terms of species, mashua reached the highest levels of genetic erosion: 24,77% average value for both field and laboratory stages, talking also into account the total variability reported in the Germplasm Catalogue of Andean Root and Tuber Crops (Tapia *et*

al., 1996). On the other hand, Cañar is the province with the highest loss of variability for the three species with an average of 46% taking into account data from the socioeconomical survey, morphological characterisation and the *ECUCOL* data base.

Finally, detection of a larger number of RAPD fragments on all on farm-conserved materials (= *CEG* accessions) in comparison with *ex situ* materials (= *ECU* accessions) confirms the nature of *in situ* conservation, i. e. a complementary methodology to *ex situ* techniques which allows continuation of evolutionary processes, natural and man-made selection, thus creating and enhancing genetic diversity in ecosystems.