



**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN
Y ENSEÑANZA**

ESCUELA DE POSGRADO

**Caracterización morfológica y molecular de la colección de
Dioscorea spp. del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico
Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado
como requisito para optar por el grado de

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

por

Zanya Itzel Aguilar Reyes

Turrialba, Costa Rica, 2012

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por la División de Educación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE EN AGRICULTURA ECOLÓGICA

FIRMANTES:

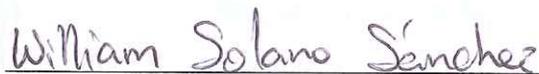


Fernando Casanoves, Ph.D.
Co-Director de tesis

Nelly Vásquez, Ph.D.
Co-Directora de tesis



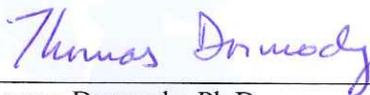
Federico Albertazzi, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



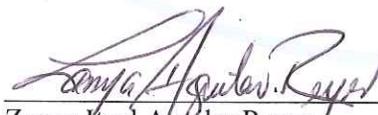
William Solano, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Carlos Astorga, M.Sc.
Miembro Comité Consejero



Thomas Dormody, Ph.D.
Decano de la Escuela de Posgrado



Zanya Itzel Aguilár Reyes
Candidata

DEDICATORIA

A Dios Todopoderoso, a la Santísima Virgen de los Ángeles y mi ángel custodio por ser motivos de mi fortaleza, compañía y crecimiento espiritual en mis momentos de soledad y desespero.

A mi madre, Leonidas Reyes Arenas con el más grande de los amores por su tenacidad y superación aún en las adversidades. Gracias por extrañarme en la distancia que nos separó estos años.

A mis hermanas; Yaneth y Velky, con mucho amor y cariño. A mi niño lindo, Saúl Andrés por llenar de alegría y asombro mis días. A mi tía Cristobalina Reyes por ser una mujer valiente ante las tragedias de su vida.

A Josep María por ser el compañero inseparable estos años lejos de casa. Gracias, por devolverme al sendero de la luz y caminarlo juntos con toda la confianza. A Doña Montserrat Cabot y a Jan.

A la memoria de Mary Rosy Reyes, Leticia González Reyes, Juan Antonio Cedeño y Ritzela Ruiz. Todos perdidos en ésta etapa de mi vida. A la memoria de Don Melitón quien en sus ojos me expresaba la magia que existe en la vida.

Y a todos ustedes que no menciono con nombres propios pero que de forma desinteresada me brindaron su orientación, ánimo y apoyo en mi caminar por el CATIE en mi fase de estudio, tesis (trabajo de campo y laboratorio). Muchísimas gracias.

“Todo ser humano puede proponerse objetivos tras haber hecho una reflexión meramente espiritual, pero no puede alcanzarlos sin la colaboración de su cuerpo. Torralba Francesc”.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) y al Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos (IFARHU) por ofrecerme su respaldo.

Al Global Crop Diversity Trust por contribuir con parte del financiamiento para realizar este proyecto de investigación.

A la Ph.D. Nelly Vásquez M., codirectora de Tesis quien me brindó su apoyo profesional y personal para el cumplimiento de esta investigación; así como su confianza y amistad sincera.

Al Ph.D. Fernando Casanoves, codirector de Tesis por su apoyo necesario en el asesoramiento de los aspectos estadísticos, revisión general del documento, por su franca y desinteresada amistad en todo momento, muchas gracias.

Al Ph.D. Federico Albertazzi, miembro del comité asesor, que me capacitó en el uso de la técnica molecular y fue un apoyo muy importante en el desarrollo de ésta fase de la investigación. Por dedicarme tiempo, espacio, paciencia, y ofrecerme un ambiente familiar y de amistad junto a su equipo de trabajo.

A los M.Sc. William Solano y Carlos Astorga, asesores de mi comité consejero, por brindarme acertados consejos y observaciones en la revisión y desarrollo de la investigación y del documento.

A las M.Sc. Carmen Yvonne Bieberach y Priscila Alvarado de González por sus atinados, consejos y observaciones para culminar satisfactoriamente esta etapa de mi vida.

A mis compañeros y compañeras de la Universidad de Costa Rica del Laboratorio 4 del Centro de Investigación de Biología Molecular y Celular: Ana María, Anthony, Fernando, Mariela, Melania, Ronald y Sue Hellen. Y un agradecimiento muy especial con gran cariño, admiración y aprecio para la M.Sc. Heidi Villalobos por su ayuda y comprensión.

BIOGRAFÍA

Zanya Itzel Aguilar Reyes nació en la ciudad de Santiago, Provincia de Veraguas, Rep. de Panamá en 1977. En 1995 culminó sus estudios de Bachiller en Ciencias en el Instituto Urracá de su ciudad natal. Recibió el título de Ingeniero Agrónomo con Orientación en Protección Vegetal en la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Panamá en el año 2007.

Desde octubre de 2004 labora para el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) con sede en Divisa, Provincia de Herrera en el Centro de Investigación Agropecuario Central. Entre octubre de 2004 hasta mediados del 2006, se desempeñó como colaboradora eventual en el Laboratorio de Fitopatología bajo la supervisión del Dr. Kilmer Von Chong (q.e.p.d.). En el año 2006 inicia sus labores como Asistente de Investigación en el Laboratorio de Agrobiotecnología en las áreas de Cultivo de Tejidos y Biología Molecular bajo la supervisión de las M.Sc. Carmen Bieberach y Priscila Alvarado de González. Actualmente, se desempeña como Investigadora y Gerente del Proyecto “Conservación in vitro de germoplasma de especies agámicas con prioridad nacional”

En enero de 2009 ingresó al Programa de Maestrías del Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Turrialba, Costa Rica y egresa en enero de 2012 como Magister Scientiae en el área de Agricultura Ecológica.

CONTENIDO

<i>DEDICATORIA</i>	<i>III</i>
<i>AGRADECIMIENTOS</i>	<i>IV</i>
<i>BIOGRAFÍA</i>	<i>V</i>
<i>CONTENIDO</i>	<i>VI</i>
<i>RESUMEN</i>	<i>VIII</i>
<i>SUMMARY</i>	<i>IX</i>
<i>ÍNDICE DE CUADROS</i>	<i>X</i>
<i>ÍNDICE DE FIGURAS</i>	<i>XII</i>
<i>ÍNDICE DE ANEXOS</i>	<i>XIII</i>
<i>LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS</i>	<i>XIV</i>
<i>1 INTRODUCCIÓN</i>	<i>1</i>
1.1 <i>Objetivo del estudio</i>	<i>4</i>
1.1.1 <i>Objetivo general</i>	<i>4</i>
1.1.2 <i>Objetivos específicos</i>	<i>4</i>
1.2 <i>Hipótesis del estudio</i>	<i>4</i>
<i>2 REVISIÓN DE LITERATURA</i>	<i>5</i>
2.1 <i>Cultivo de ñame (Dioscorea spp.)</i>	<i>5</i>
2.1.1 <i>Origen</i>	<i>5</i>
2.1.2 <i>Distribución geográfica y biodiversidad genética</i>	<i>5</i>
2.1.3 <i>Botánica del cultivo</i>	<i>7</i>
2.1.4 <i>Plagas y enfermedades</i>	<i>8</i>
2.2 <i>Importancia social y económica del ñame</i>	<i>9</i>
2.3 <i>Proyecciones a futuro en el mejoramiento genético de Dioscorea sp.</i>	<i>11</i>
2.4 <i>Importancia de los Bancos de Germoplasma y Recursos Fitogenéticos</i>	<i>13</i>
2.5 <i>Caracterización del germoplasma</i>	<i>15</i>
2.5.1 <i>Caracterización morfológica</i>	<i>15</i>
2.5.2 <i>Caracterización molecular – Marcadores moleculares</i>	<i>16</i>
2.6 <i>Tecnología de Fragmento Amplificado Longitud Polimórfico (AFLP)- Metodología</i> ...	<i>18</i>
2.7 <i>Ventajas y desventajas de los AFLP</i>	<i>20</i>
2.8 <i>Estudios realizados en Dioscorea spp.</i>	<i>20</i>
2.8.1 <i>Estudios morfológicos y moleculares en Dioscorea spp.</i>	<i>21</i>
2.9 <i>Relación entre la caracterización morfológica y molecular</i>	<i>23</i>
<i>3 Materiales y Métodos</i>	<i>25</i>
3.1 <i>Fase de Campo</i>	<i>25</i>

3.1.1	<i>Localización del estudio</i>	25
3.1.2	<i>Caracterización morfológica</i>	25
3.1.3	<i>Material experimental</i>	25
3.1.4	<i>Manejo agronómico</i>	25
3.1.5	<i>Caracterización de cultivares, descriptores y registro</i>	29
3.2	<i>Fase de laboratorio</i>	29
3.2.1	<i>Capacitación</i>	29
3.2.2	<i>Localización del estudio</i>	30
3.2.3	<i>Técnica para la caracterización molecular</i>	30
3.2.4	<i>Material experimental</i>	30
3.2.5	<i>Extracción de ADN</i>	30
3.2.6	<i>Determinación de la concentración de ADN</i>	30
3.2.7	<i>Purificación del ADN</i>	31
3.2.8	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN con la técnica de AFLP</i>	31
3.2.9	<i>Visualización del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados</i>	32
3.3	<i>Análisis estadístico</i>	32
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1	<i>Caracterización morfológica</i>	35
4.1.1	<i>Comportamiento biológico de la población para la caracterización morfológica</i>	35
4.1.2	<i>Análisis descriptivo de la población</i>	38
4.1.3	<i>Análisis estadístico inferencial de los datos de la población</i>	46
4.1.4	<i>Agrupación de las accesiones en función de variables cualitativas</i>	52
4.1.5	<i>Agrupación de las accesiones en función de variables cualitativas y cuantitativas</i>	60
4.2	<i>Caracterización molecular</i>	63
4.2.1	<i>Comportamiento biológico de la población para la caracterización molecular</i>	63
4.3	<i>Comparación de la variabilidad detectada a partir de características morfológicas y marcadores moleculares</i>	67
5	CONCLUSIONES	73
6	RECOMENDACIONES	74
7	LITERATURA CITADA	75
8	ANEXOS	79

RESUMEN

En el presente estudio caracterizó la colección de ñame (*Dioscorea* spp.) del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). La colección cuenta con aproximadamente 63 accesiones de ñame provenientes de Barbados, Costa Rica, Estados Unidos, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Panamá, Puerto Rico y otras de procedencia desconocida. Su conservación en el banco de germoplasma data de los años 70 y 80; y su importancia consiste en la duplicación y conservación de sus accesiones. En la caracterización morfológica se trabajó 60 caracteres definidos por el IPGRI/IITA (1997) y en 59 accesiones de *Dioscorea* spp. de especies *Dioscorea alata*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea cayensis*, *Dioscorea dumetorum*, *Dioscorea esculenta*, *Dioscorea pentaphylla*, *Dioscorea* sp. y *Dioscorea trifida* con cinco plantas por acción en el ensayo. Se utilizaron sólo 60 descriptores (IPGRI 1997) para evaluar 23 características cuantitativas y 37 cualitativas de características de desarrollo vegetativo de tallo, hojas, floración, fruto, tubérculos aéreos y subterráneos. Con estos descriptores se definieron 6 grupos de accesiones por las características cuantitativas mediante un conglomerado jerárquico, utilizando el método de Ward y la distancia Euclídea, obteniendo como resultado que estos grupos son estadísticamente diferentes (MANOVA, $p < 0.0001$; gDGC multivariado, $p < 0.05$). De las 23 características sólo 10 fueron más discriminantes, estas son: días de brote, longitud del tallo joven, número de entrenudos del tallo joven, número de tallos maduros por planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo maduro, longitud de los entrenudos en el tallo maduro, número de hojas jóvenes y número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas. En la caracterización molecular se evaluaron 46 accesiones con la técnica molecular de AFLP y 6 combinaciones de enzima/primer. El análisis molecular no permitió la separación de las accesiones de la colección por especies, quizás por la poca cantidad de combinaciones estudiadas Sólo el Grupo 3 en el conglomerado con el método de Ward y la distancia calculada con la similitud de Gower, para los datos combinados presenta las accesiones *D. alata* provenientes de Puerto Rico.

Palabras claves: AFLP, Caracterización morfológica, Caracterización molecular, Conservación de germoplasma, *Dioscorea* spp.

SUMMARY

In the present study, we characterized the collection of yam (*Dioscorea* spp.) from Germplasm Bank of Tropical Agricultural Research and Higher Education (CATIE). The collection has approximately 63 accessions of yam from Barbados, Costa Rica, USA, Guadeloupe, Guatemala, Honduras, Panama, Puerto Rico and others of unknown origin. Conservation in the gene bank dated from the 70 and 80`s, and its importance is due to duplication and preservation of the accessions. The morphological characterization was done with characters defined by IPGRI / IITA (1997) in 59 accessions (five plants each) of *Dioscorea* spp. species: *Dioscorea alata*, *Dioscorea bulbifera*, *Dioscorea cayensis*, *Dioscorea dumetorum*, *Dioscorea esculenta*, *Dioscorea pentaphylla*, *Dioscorea* spp. *Dioscorea trifida*. We used only 60 descriptors (IPGRI 1997) to evaluate 23 and 37 qualitative and quantitative characteristics of vegetative growth characteristics of stem, leaf, flower, fruit, tubers and underground. These descriptors defined 6 groups of accessions for the quantitative characteristics using a hierarchical cluster, with Ward method and Euclidean distance. The groups were statistically different (MANOVA, $P < 0.0001$; multivariate gDGC, $p < 0.05$) . The more discriminating, descriptors were days of the outbreak, young stem length, number of internodes of the young stem, number of mature stems per plant, number of internodes to first branch, number of branches on the ripe stem, mature stem diameter, length of internodes in the mature stem, leaf number and number of internodes young leaves to fully open. The molecular characterization was made over 46 accessions with AFLP molecular technique and 6 combinations of enzyme/primer. Molecular analysis did not allow separation of the accessions of the collection by species, perhaps by the small number of combinations studied. Only in one group the cluster with the Ward method join the accession of *D. alata* from Puerto Rico.

Keywords: AFLP, morphological characterization, molecular characterization, Germoplasm conservation, *Dioscorea* spp.

ÍNDICE DE CUADROS

<i>Cuadro 1. Países ¹ y zonas geográficas² con colecciones de germoplasmas de ñame</i>	<i>14</i>
<i>Cuadro 2. Cronología de los principales marcadores de ADN usados actualmente.....</i>	<i>17</i>
<i>Cuadro 3. Eficiencia de algunos marcadores moleculares.....</i>	<i>18</i>
<i>Cuadro 4. Principales diferencias entre marcadores morfológicos y moleculares</i>	<i>24</i>
<i>Cuadro 5. Accesiones de Dioscorea spp. de la colección del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) utilizadas para el estudio.....</i>	<i>26</i>
<i>Cuadro 5 (Cont.). Accesiones de Dioscorea spp. de la colección del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) utilizadas para el estudio</i>	<i>27</i>
<i>Cuadro 6. Combinaciones utilizadas en el screening para seleccionar mayor polimorfismo .</i>	<i>32</i>
<i>Cuadro 7. Estadísticas descriptivas para las variables cuantitativas completas en tallos y hojas de las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)</i>	<i>39</i>
<i>Cuadro 8. Análisis de frecuencia para las características cualitativas del tallo joven para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>40</i>
<i>Cuadro 9. Análisis de frecuencia para las características cualitativas del tallo maduro para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>41</i>
<i>Cuadro 10. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja joven para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>42</i>
<i>Cuadro 11. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)</i>	<i>43</i>
<i>Cuadro 11. (Cont.). Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 12. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la floración para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>44</i>
<i>Cuadro 13. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de los tubérculos aéreos para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.).....</i>	<i>45</i>

<i>Cuadro 14. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la altura del tallo maduro y la longitud del peciolo de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)</i>	45
<i>Cuadro 15. Estadísticas descriptivas de los 6 grupos formados usando descriptores cuantitativos completos</i>	48
<i>Cuadro 16. Análisis discriminante para las variables cuantitativas-datos estandarizados con las varianzas comunes</i>	51
<i>Cuadro 17. Tabla de clasificación cruzada para los grupos formados</i>	51
<i>Cuadro 18. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte del tallo</i>	55
<i>Cuadro 19. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de la hoja</i>	56
<i>Cuadro 19 (Cont.). Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de la hoja</i>	57
<i>Cuadro 20. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de floración</i>	57
<i>Cuadro 21. Combinaciones “enzima/primers” utilizadas, promedio de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo, bandas únicas y rango de amplificación</i>	65
<i>Cuadro 22. Proporción de loci polimórficos, índice de Nei (1973) y el índice de Shannon para 366 loci- polimórficos en 46 individuos de Dioscorea sp.</i>	67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Accesiones de <i>Dioscorea</i> spp. creciendo en campo para caracterización morfológica.	28
Figura 2. A. Primera siembra. B. Retención de agua lluvia en el cultivo. C. Presencia de enfermedades en la accesión 7305. D. Ataque de hormigas arrieras (<i>Atta</i> sp.) a la accesión 6319.....	36
Figura 3. Características incompletas evaluadas. A. Floración. B. Tubérculos aéreos	38
Figura 4. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia Euclídea) de las variables cuantitativas completas caracterizadas en 59 accesiones de ñame (<i>Dioscorea</i> spp.).....	49
Figura 5. Gráfico de funciones discriminantes entre grupos para las 59 accesiones de ñames (<i>Dioscorea</i> spp.) descritas.....	50
Figura 6. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de coordenadas principales usando distancias de Euclídea para el conjunto de descriptores cuantitativos.	52
Figura 7. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Jaccard) de las variables cualitativas completas.....	53
Figura 8. Gráfico Biplot obtenido del análisis de correspondencia de las variables cualitativas más discriminantes (PTM, CPHJ, THM, CPHM y F).....	58
Figura 9. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de coordenadas principales usando el índice de similitud de Jaccard y el conjunto de descriptores cualitativos.	59
Figura 10. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Gower) de las variables cualitativas y cuantitativas completas.	61
Figura 11. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de Coordenadas Principales usando distancia construida a partir del índice de similaridad de Gower para los descriptores cuantitativos y cualitativos completos.....	62
Figura 12. Análisis de Coordenadas principales de AFLP en <i>Dioscorea</i> spp.	66
Figura 13. Patrones totales de bandas binarias (haploides) entre poblaciones.	68
Figura 14. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward y la distancia calculada con Rogers y Tanimoto) para datos moleculares.	69
Figura 15. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Gower) de las variables cualitativas y cuantitativas completas con la información molecular.	70

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1. Descriptores morfológicos para el cultivo de ñame (<i>Dioscorea</i> spp.)	80
Anexo 2. Protocolo Método de CTAB para la Extracción de ADN de <i>Dioscorea</i> spp. (Doyle y Doyle 1987) modificado por Heidy Villalobos (2011)	84
Anexo 3. Protocolo para la purificación del ADN con RNasa A.	85
Anexo 4. Preparación de Buffer de Extracción CTAB 2%	86
Anexo 5. Protocolo de AFLP de Invitrogen modificado por Federico Albertazzi (2011)	86
Anexo 6. Preparación del gel grande de Acrilamida 4% (19:1)	90
Anexo 7. Tinción de Plata para Geles grandes de Acrilamida	90
Anexo 8. Prueba gDGC multivariadas de las variables cuantitativas completas	91
Anexo 9. Listado de las accesiones de <i>Dioscorea</i> spp. del CATIE, analizadas con marcadores moleculares AFLP	92

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

µg	Micro gramos
ADN	Ácido desoxirribunucleico
AFLP	Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica
ARN	Ácido ribonucleico
CATIE	Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza
CGIAR	Grupo Consultivo de Investigación Agrícola Internacional
CIBCM	Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular
CIP	Centro Internacional de la Papa
CIRAD	Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo
CNP	Consejo Nacional de Producción
CP	Coordenadas principales
CPHJ	Color del peciolo de la hoja joven
CPHJ	Color del peciolo de la hoja joven
CPHM	Color del peciolo de la hoja madura
CPHM	Color del peciolo de la hoja madura
CR	Costa Rica
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
CV	Coefficiente de variación
DB	Días de brote
ddb	Días después del brote
Desc.	Desconocido
DTM	Diámetro del tallo maduro
<i>EcoRI</i>	Enzimas de Restricción de corte raro
F	Floración
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
IBPGR	Consejo Internacional Recursos Fitogenéticos
IDIAP	Instituto de Investigación Agropecuario de Panamá
IFARHU	Instituto para la Formación y Aprovechamiento de Recursos Humanos
IG	Índice genético
IITA	Instituto Internacional de Agricultura Tropical
INRAB	Instituto Nacional de Investigación Agrícola de Benín
IPGRI	Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos
IRD	Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia
Kb	Kilo base.

LETM	Longitud de los entrenudos en el tallo maduro
LTJ	Longitud del tallo joven
m	Metros
ml	Mililitros
<i>Mse</i> 1	Enzimas de Restricción de corte frecuente
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NEHTA	Número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas
NEPR	Número de entrenudos hasta la primera ramificación
NETJ	Número de entrenudos en el tallo joven
NHJ	Número de hojas jóvenes
nm	Nano moles
NRTM	Número de ramificaciones en el tallo maduro
NTMP	Número de tallos maduros por planta
°C	Grados centígrados
OD	Longitud de onda
pb	Pares de base.
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PR	Puerto Rico
RAPD	Amplificación de ADN al Azar
RFLP	Restricción de Fragmentos Polimórficos
RNase A	Ribonucleasa A
s/f	Sin fecha
SIIM	Sistema de Información e Inteligencia de Mercado
SSR	Simple Sequence Repeat (Microsatélites)
UCR	Universidad de Costa Rica
USDA	Departamento de Agricultura de los Estados Unidos
VNTR	Minisatélites
YMV	Virus del mosaico del ñame

1 INTRODUCCIÓN

Los cultivos de raíces y tubérculos desempeñarán una función múltiple en la alimentación del mundo en desarrollo durante las próximas décadas. Para el 2020, más de 2 mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de estos cultivos como fuentes de alimentos, forraje o ingresos en efectivo. Mientras; que la adaptación a ecologías marginales, su contribución a la seguridad alimentaria familiar y su gran flexibilidad en los sistemas agrícolas mixtos, los convertirán en un componente importante de las estrategias para ayudar a mejorar el bienestar de los pequeños agricultores. En los hogares rurales, dicha contribución reside en su capacidad de producir más energía digerible por hectárea por día, que cualquier otro producto básico, y en su capacidad de seguir produciendo en condiciones donde otros cultivos fracasan (CIP 1999).

El ñame (*Dioscorea* spp.) junto a otras raíces y tubérculos, son productos de exportación hacia muchos países. Nigeria, Ghana, Costa de Marfil y otros países africanos concentran alrededor de un 96% de la producción mundial del ñame (Interletras 2011).

Los países americanos que más destacan en la producción de ñame son: Brasil, Colombia, Costa Rica, Panamá y Jamaica. El departamento del Comercio de Estados Unidos indicó que importó en enero de 2011 un total de 2,332 toneladas de ñame (SIIM/CNP 2011; Interletras 2011).

La gran demanda de ñame y otros productos tropicales se deben a migraciones significativas de hispano-americanos y asiáticos del tercer mundo a Norteamérica y Europa. Se puede observar que para algunos consumidores del primer mundo es importante enriquecer sus dietas con más fibras y menos grasas; mientras que otros, lo hacen para no perder costumbres ancestrales de sus lugares de origen. Todos estos cambios definen una oportunidad y un desafío para los productores e investigadores tropicales de raíces y tubérculos (Rodríguez 1994).

Actualmente, agricultores, comerciantes e investigadores buscan satisfacer las demandas del mercado ofreciendo los mejores productos a los países exportadores. Para esto, es importante conservar los materiales específicos de gran valor, mejorar la calidad y rendimientos de los productos en los lugares de origen, con el fin de cumplir con las demandas

de los países importadores. Es posible que con investigaciones realizadas se hayan desarrollado alternativas de conservación *in situ* y *ex situ*, como los jardines botánicos y los bancos de germoplasma, en centros de origen o centros de diversidad para mantener el germoplasma bajo las condiciones culturales de manejos propios del lugar de origen.

La finalidad de los bancos de germoplasma; actualmente existentes es la conservación de semillas, polen, clones y cultivos *in vitro* a mediano y largo plazo de cultivos de importancia económica, alimenticia, y medicinal en óptimas condiciones de almacenamiento. Entre sus principales actividades están la conservación en bancos de semilla, bancos de polen, bancos de clones y bancos de conservación *in vitro* existentes.

El Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) promueve hoy día, la conservación, caracterización y utilización del germoplasma, poniéndolo a disposición para el beneficio de los agricultores en su región de mandato (América Latina y el Caribe) y fuera de ella. Las colecciones de campo en el CATIE con su sede en Turrialba, Costa Rica, incluyen un total de 11,409 accesiones. Entre ellas tiene 6,658 accesiones de semillas ortodoxas conservadas en cámaras frías, y 4751 de semillas recalcitrantes conservadas en campo. Entre los cultivos conservados considerados altamente prioritarios en la conservación a nivel regional (América Central, Norte y Sur), podemos mencionar el café (*Coffea* spp.), cacao (*Theobroma & Herrania* spp.), chile (*Capsicum* spp.), y tomate (*Solanum* spp.), entre otras. Para Mayo de 2004, el CATIE puso sus colecciones de germoplasma bajo el auspicio de la FAO (Ebert et ál. 2007).

El banco de germoplasma del CATIE, conserva en su colección por lo menos unas 63 accesiones de ñame provenientes de países como: Barbados, Costa Rica, Estados Unidos, Guadalupe, Guatemala, Honduras, Panamá, Puerto Rico y otras de procedencia desconocida. Estas accesiones fueron recolectadas en un periodo comprendido entre los años 1977 a 1982, y su importancia consiste en la duplicación y conservación de sus accesiones. Actualmente; este banco de germoplasma cuenta con una colección única de estas accesiones en la región y por su importancia para la seguridad alimentaria y los programas de mejoramiento genético, se requiere un estudio que permita caracterizarlas no solo morfológicamente, sino también por sus características moleculares.

Para conservar el germoplasma se requiere de una serie de recopilación de información conocida como datos de pasaporte, y que es la información mínima en estos casos. El uso de estos materiales vegetativos conservados requiere de la ampliación de información o nociones sobre cada uno; por ello, se hacen caracterizaciones morfológicas que describen cada accesión o material del banco de germoplasma.

Una caracterización morfológica se basa en el uso de guías elaboradas previamente por instituciones de vanguardia dedicadas a la investigación en cultivos definidos. Los descriptores utilizados en las caracterizaciones morfológicas deben ser prácticos y de precisión, para determinar a simple vista los aspectos cualitativos y cuantitativos relevantes que deben ser evaluados por el responsable en los procesos de multiplicación y regeneración de las accesiones.

Así como la caracterización morfológica cumple con una serie de normas establecidas, la caracterización molecular cumple con una serie de técnicas y protocolos establecidos por investigadores expertos en el uso de herramientas como los marcadores moleculares. Dichas técnicas permiten entre algunas cosas, construir mapas de ligamiento genético cada vez más completos y precisos, en donde se puede identificar posiciones en los cromosomas que están relacionadas con características de importancia agronómica; ya sea, mono o poligénicas, como es la resistencia a enfermedades, la producción, la calidad, etc. Esto permite en etapas posteriores, la selección precoz de organismos y la ubicación y selección de genes de interés (Phillips 1998).

Los marcadores moleculares son una variación con respecto al estudio de estrategias clásicas. Las metodologías que requiere son aplicadas a cualquier gen o producto genéticos; por lo que el grado de la variación que se dé, va a depender de las mutaciones que se presenten en la parte del genoma que se investigue

Es así, que por la necesidad de conocer y diferenciar mejor las accesiones conservadas en esta colección, se propuso el presente trabajo con el fin de caracterizar (morfológica y molecular) las accesiones de *Dioscorea* spp. presentes en la colección del CATIE. Esto permitió determinar si existía o no duplicidad de las accesiones en estudio; al mismo tiempo que permitió hacer una caracterización morfológica y genotípica según sus características. De

igual manera, se conoció el tipo y disponibilidad de materiales con importancia para investigaciones futuras, por ejemplo, con resistencia a enfermedades. Los resultados alcanzados significan un paso de avance en el fortalecimiento del banco de datos; así como para contar con un posible depositario de la réplica de estas accesiones en la región.

1.1 Objetivo del estudio

1.1.1 Objetivo general

Caracterizar fenotípica y genotípicamente la variabilidad existente en los genotipos de *Dioscorea* spp. conservados en el Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE).

1.1.2 Objetivos específicos

- Determinar el grado de variabilidad morfológica y molecular de las accesiones de *Dioscorea* spp. en estudio y caracterizar morfológica y molecularmente las accesiones.
- Clasificar los genotipos en función de las características morfológicas, genotípicas y en mezclas conjuntamente.
- Determinar el grado de concordancia entre la información morfológica y la genotípica.

1.2 Hipótesis del estudio

- Los descriptores morfológicos permitirán separar en grupos algunas de las accesiones de *Dioscorea* spp.
- La técnica molecular de AFLP es efectiva para la diferenciación genética entre los genotipos dentro de las accesiones de *Dioscorea* spp. bajo estudio
- Existe diferencia morfológica y molecular entre las accesiones de *Dioscorea* spp. bajo estudio.
- Existe concordancia entre grupos formados a partir de datos morfológicos y moleculares.

2 REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Cultivo de ñame (*Dioscorea spp.*)

2.1.1 Origen

El género *Dioscorea* comprende más de 600 especies distribuidas en su totalidad en la zona húmeda intertropical; y es conocido con los nombres de Ñame, Yam, Cará, Batata Amarilla, Cabeza de Negro, Ignose, Ñangate, Iñame, etc. (Agroconocimiento 1977). Debido a que su domesticación ha ocurrido independientemente en Asia, África y América, existen tres fuentes de origen para las seis especies principales de ñame comestibles: *D. trifida* de la cuenca amazónica en América del Sur; el complejo *D. cayenensis-rotundata* y *D. dumetorum* en África Occidental; *D. alata* y *D. esculenta* en el Sureste de Asia y *D. bulbifera* en África Occidental y/o Sureste de Asia. (Montaldo 1991).

En muchos pueblos de África tropical, del Pacífico y las zonas del Caribe, el ñame es parte fundamental de su dieta, siendo cultivado en gran escala (Melaurie et ál. 1998, citado por Rodríguez et ál. 2009)

2.1.2 Distribución geográfica y biodiversidad genética

Coursey (1976) y Mandal (1993), citados por González (2003) plantean que la familia Dioscoreaceae comprende seis géneros; siendo el género *Dioscorea*, el mayor. Entre las 600 especies de *Dioscorea spp.*, se han identificado doce especies comestibles y con valor comercial, entre las que más destacan: *Dioscorea alata*, *D. rotundata*, *D. esculenta*, *D. bulbifera*, y *D. cayenensis*, las cuales son cultivadas principalmente en África.

Según Montaldo (1991) y González (2003); a nivel mundial las especies utilizadas con mayor importancia en la producción para la alimentación son:

* *Dioscorea cayenensis*: Rizoma solitario de 1 a 10 kg, es generalmente grueso y ramificado. Pulpa amarilla o blanca. Se almacena mal pues tiene corto período de reposo. Tallos cilíndricos, espinosos, que se enrollan a la derecha. Hojas simples enteras, opuestas o

alternas, acorazonadas. Especie muy cultivada en África Occidental y algo en América Tropical; sigue en importancia mundial a *D. alata*.

**Dioscorea alata*: Originaria del Sudeste Asiático. En la actualidad constituye la especie más cultivada en los trópicos. Con rizomas solitarios o agrupados de 2 a 4, redondos, cilíndricos, oblongos o de forma irregular, 0.40 a 1m. Algunos rizomas pueden llegar a pesar 20-30 kg. Presencia de tubérculos aéreos. Tallos fuertes alados sin espinas, verdes o púrpuras. La torsión de los tallos es en sentido contrario al movimiento de los punteros del reloj. Hojas acorazonadas, simples y opuestas.

**Dioscorea esculenta*: Cultivada en el Sudeste de Asia y África. Rizomas pequeños de 5 a 15 cm de largo; la planta produce varios en forma de racimos, ovoides y buenos al paladar. Tallos cilíndricos, espinosos que se enrollan a la izquierda, y con hojas simples acorazonadas más pequeñas que en otras especies comestibles.

**Dioscorea bulbifera*: Un solo rizoma por planta, blanco y globoso y un poco alargado, a veces amargo y no comestible. Tubérculos aéreos que suelen llegar a 1 ó 2 kg y que se usan como alimento. Tallo cilíndrico sin espinas, hojas simples, enteras, grandes, alternas u opuestas. Cultivada en el Sudeste de Asia, África y algo en las Islas del Pacífico y en Las Antillas.

**Dioscorea trifida*: Originaria y cultivada en América Tropical y parte en el Sudeste de Asia. Rizomas pequeños no más de 15 cm de largo, redondos o cónicos. Pulpa blanca, amarilla o púrpura. Excelente calidad culinaria. Tallos cuadrangulares, alados y sin espinas; con torsión a la izquierda y hojas palmadas profundamente lobuladas, alternas raramente opuestas.

Las ñames comestibles más importantes pertenecen a unas pocas especies como *D rotundata* Poir. (ampliamente conocida como ñame blanco de Guinea), *D. alata* L. (conocida como ñame de agua, ñame alado o gran ñame), *D cayenensis* Lam. (ñame amarillo o ñame amarillo de Guinea; puede ser un complejo de diferentes especies), *D. esculenta* (Lour.) Burkill (ñame menor, batata de China o ñame chino), *D. dumetorum* (Kunth) Pax (ñame amargo o ñame trifoliado), *D. bulbifera* L. (ñame aéreo de patata), *D. trifida* L.f (mapuey), *D. opposita* auct. (ñame canela) y *D. japonica* Thunb. (Dumet y Ogunsola 2008).

2.1.3 Botánica del cultivo

2.1.3.1 Taxonomía

Las dioscoreáceas (Dioscoreaceae), son una familia de plantas monocotiledóneas largamente tropicales, más o menos herbáceas con flores pequeñas y no muy coloridas, el ovario es ínfero y muchas veces con cresta o alas en el fruto. Muchas son trepadoras reconocidas por sus hojas espiraladas, pecioladas, con pulvino en los dos extremos del pecíolo, la base de la hoja no rodea el tallo. La lámina tiene muchas venas fuertemente longitudinales y venas secundarias transversas, o venación finamente reticulada (Montaldo 1991).

Según el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA 2007) citados por Espinoza et ál. (2008), la clasificación taxonómica del ñame es la siguiente:

Reino: Plantae
Subreino: Tracheobionta
Superdivisión: Spermatophyta
División: *Magnoliophyta*
Clase: *Liliopsida*
Subclase: *Liliidae*
Orden: *Liliales*
Familia: *Dioscoreaceae*
Género: *Dioscorea* L
Especies: varias

2.1.3.2 Morfología

La planta de ñame es dioica aunque pueden presentarse monoicas y existen cultivares que no florecen. El fruto es una cápsula dehiscente de uno a tres centímetros de longitud, con dos semillas por lóbulos. Las semillas son pequeñas con estructuras aladas (Jiménez y Hernández 2009).

Los ñames son plantas volubles de tallo aéreo anual que pueden llevar o no espinas. Sus hojas son alternas y opuestas, largamente pecioladas. Sus tallos son alados o de sección

transversal ovalada. En algunas especies se les forma tuberculillos aéreos en las axilas de las hojas (Montalvo 1983).

Es una planta herbácea, escalada, monocotiledónea tropical, que parece más bien una dicotiledónea y forma parte de un linaje que guarda estrecha relación con el grupo filogenéticamente derivado que contiene a las hierbas (Mignouna et ál. 2009).

Los tallos de las plantas necesitan de un tutor o soporte para su proceso de crecimiento. La forma varía según la especie, y los hay cuadrangulares, alados, redondos, con o sin espinas. Usualmente las hojas son alternas y espirales, opuestas o verticiladas, simples, pero a veces palmadamente lobadas o compuestas, enteras, diferenciadas en peciolo y lámina, con venación palmada, las venas mayores convergiendo y conectadas por una red de venas de mayor orden (Jiménez y Hernández 2009).

Las flores son muy pequeñas en racimos de tres sépalos y tres estambres. La floración es muy escasa en casi todas las especies alimenticias cultivadas (Montalvo 1983).

Los tubérculos pueden ser solitarios o en grupos. Las yemas proximales del tubérculo producen uno o más tallos aéreos. Las yemas laterales forman tubérculos secundarios. El peso de los tubérculos puede ir desde los 50 hasta los 100 g (Montalvo 1983).

Tiene un sistema radicular fibroso con crecimiento horizontal y con poca penetración, y su desarrollo ocurre tempranamente. En las primeras seis semanas posteriores a la siembra emergen las raíces, y crecen extensivamente a través del suelo. Las raíces se convierten en órganos subterráneos de reserva. Las especies de *Dioscorea* tienen los tubérculos de forma y tamaño variable: cilíndricos, aplanados simples o divididos. El tubérculo viejo se usa como fuente de alimento para la planta nueva (Jiménez y Hernández 2009).

2.1.4 Plagas y enfermedades

Las principales plagas del cultivo de ñame son: a) las hormigas arrieras (*Atta* sp.) que causan defoliación en etapas críticas del desarrollo del cultivo (germinación y crecimiento de las guías); b) los roedores (ratas y taltuzas), son mamíferos que excavan el suelo y se alimentan de los tubérculos, el control se logra con el uso de trampas y cebos; y c) las babosas

que succionan jugos de las guías jóvenes y tubérculos, y manchan la cáscara de los tubérculos. Se consideran una plaga de poca importancia: pero el cultivo continuo en las mismas parcelas incrementa las poblaciones y el daño a los tubérculos (Rojas et ál. 2007).

Los principales problemas fitopatológicos del ñame son causados por hongos y nemátodos. La principal enfermedad del follaje es la antracnosis, causada por *Colletotrichum gloeosporoides*. Ella se presenta en las hojas y tallos como pequeñas manchas marrón, que se agrandan, seguido de un amarillamiento, secado y muerte de las hojas y tallos (Rojas et ál. 2007).

Adicionalmente; se tienen otras enfermedades como: *Curvularia*, *Cercospora*, *Fusarium* y *Sclerotium*. Los nemátodos *Scutellonema bradys*, *Pratylenchus* sp y *Meloidogyne* sp, afectan principalmente los tubérculos de ñame produciendo lesiones que favorecen la entrada de hongos (Rojas et ál. 2007).

2.2 Importancia social y económica del ñame

Los cultivos de raíces y tubérculos que comprenden principalmente la papa, la yuca, el camote y el ñame son de gran importancia a nivel mundial; ya que juegan un papel importante en la alimentación global y se ha dado un aumento de las tierras cultivadas. El incremento en la demanda de estos cultivos se debe a sus altas concentraciones de carbohidratos, calorías, minerales y proteínas, porque se busca suplir las demandas de los cereales. La principal limitante de debe a aspectos culturales y tecnológicos (Montaldo 1991).

Según Mignouna et ál. (2009) *Dioscorea* es un género comprendido por muchas especies importantes con tubérculos comestibles como alimento y como fuentes de sustancias bioactivas utilizadas en una amplia gama de aplicaciones. Considerado como un alimento importante en muchas partes del mundo, especialmente en África Occidental y las islas del Pacífico, está descuidado; su importancia puede aumentar debido al cambio climático y la necesidad de buscar nuevas opciones en los sistemas alimenticios mundiales.

El ñame es un cultivo de mucha importancia alimenticia, aunque es menos rico e vitaminas A y C, tiende a ser más alto en proteínas y minerales como el fosforo y potasio (CGIAR s/f).

Para Rodríguez (1994), el ñame junto a la yuca, tiquizque, ñampí y malanga no alcanzan rendimientos óptimos por encima de los mil metros sobre el nivel del mar, donde las temperaturas promedio son inferiores a los 24°C.

Estos cultivos son consumidos y producidos por la mayoría de los pobres y pequeños agricultores con mayor inseguridad alimentaria. Además son fuentes importantes de ingresos y empleos en las áreas rurales, con frecuencia marginales. Según un escenario futuro el uso total de raíces y tubérculos en los países en desarrollo muestra un incremento proyectado de 232 millones de toneladas a 635 millones de toneladas entre los años 1993 y el 2020, un incremento del 58%, del cual un 44% corresponderá a la yuca, 29% a la papa y 27% al camote y ñame (Scott et ál. 2000).

Según la Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO, con sus siglas en inglés) (2010) en el 2009, las raíces y tubérculos (yuca, ñame, camote y una variedad de aráceas) presentaron un área cosechada de 53,666 ha y una producción de 752,632 ton a nivel mundial.

En el balance de alimentos de raíces y tubérculos de la FAO (2010) para los años comprendidos entre 2005 y 2007 la producción mundial fue de 714,339 ton; 45,204 ton en exportaciones; 49,866 ton en importaciones; 308,021 ton para otros usos y para suministro de alimentos 410,981 ton.

El análisis de mercado de ñame del Sistema de Información e Inteligencia de Mercado y el Consejo Nacional de Producción (SIIM/CNP) (2009), coloca a Jamaica como el mayor proveedor de ñame con 45.22% seguido por Costa Rica (44.10%), Colombia (9.35%) y Panamá con el 0.99%, República Dominicana (0.66%) y Nicaragua con el 0.25%. Además, podemos señalar que Costa Rica exportó a 12 países este cultivo, teniendo como principal destino Estados Unidos con 44.25% del total (4,484 toneladas), por un valor de US\$ 4.05 millones seguido por Puerto Rico que recibió el 29.83% (3,279 toneladas) del volumen total exportado y US\$ 2.88 millones (30.65% del valor) y Panamá, importó 943 toneladas (8.58%) por un valor de US\$ 814,662 (8.65%).

2.3 Proyecciones a futuro en el mejoramiento genético de *Dioscorea* sp.

Actualmente, la biotecnología ha utilizado herramientas como: análisis bioquímicos, isoenzimáticos, morfológicos, moleculares y citológicos; sin embargo, pueden existir especies con pocas diferencias a nivel bioquímico y/o morfológico, lo que dificulta la clasificación taxonómica para realizar el estudio diferencial de estas especies y requieren entonces de un estudio citogenético completo (Espinoza et ál. 2008).

Según Acosta (1980), Naranjo y Poggio (2004), (Scarcelli et ál. 2005) citado por López Pérez (1999), en un estudio cromosómico del ñame se podría afirmar que el análisis del cariotipo en cuanto a características estructurales y cuantitativas es importante en investigaciones taxonómicas y evolutivas; puesto que los cromosomas no son un sistema estático, sino que están en constante cambio como resultado del proceso de evolución. Ésta variación se expresa en características como: número, forma y tamaño y hace frecuente y normal la existencia de variación cariotípica interespecífica. Es así, como el número básico de cromosomas para *Dioscorea* $x = 10$, *D. alata* presenta un número somático de 40 y en algunos casos 81 cromosomas, *D. cayenensis* alrededor de 140 cromosomas, y para *D. bulbífera* 80 cromosomas; sin embargo, la especie *Dioscorea rotundata* ha sido considerada como diploide $2n = 40$. Por otro lado, aunque menos frecuente, también puede existir variación cariotípica intraespecífica manifestada como politipismo o polimorfismo cromosómico; por ejemplo se reporta para *D. trifida* la especie americana comestible un número básico de cromosomas igual a 9, siendo la mayoría de las especies de *Dioscorea*, tetraploides $4x = 40$, con número básico $x = 10$. La aparición de estos nuevos números básicos que no tengan relación directa con los ancestrales, es posible sí ocurren nuevas reestructuraciones o hibridaciones entre poliploides con distintos números básicos.

Para López Pérez (2008) se puede inferir la importancia que tiene la realización de análisis citogenéticos mediante la aplicación de técnicas clásicas y moleculares en especies vegetales, tales como el ñame, como fuente de información necesaria para efectuar el monitoreo de la variación somaclonal ocurrida durante la regeneración de plantas y el cultivo *in vitro*. De igual manera para realizar la identificación y selección de clones con afinidades cromosómicas en procesos de mejoramiento genético, detección de anomalías

cromosómicas estructurales y numéricas, determinación de posibles relaciones filogenéticas y evolutivas entre las especies.

Otras investigaciones sobre el cultivo del ñame buscan obtener sistemas radiculares en cultivo *in vitro* para obtención plántulas sanas. Debido a que varios microorganismos fitopatógenos, incluyendo virus, hongos y bacterias afectan al cultivo se presentan muchas veces pérdidas en la producción de ñame. En Venezuela por ejemplo, en el 2003 se realizaron pruebas bioquímicas y fisiológicas a muestras que indicaban que los aislados correspondían a *Pantoea agglomerans* (Enterobacteriaceae), con el cual se discutieron diferentes metodologías para la identificación de bacterias (Rodríguez et ál. 2008).

Para McVaugh (1989) y Zamora (1993) citado por Espinoza et ál. (2008), es muy importante destacar que diferentes especies de *Dioscorea* spp. son utilizadas como fuente de medicina en la industria farmacéutica. La causa de una excesiva explotación se debe a la producción de estos compuestos químicos y de sustancias venenosas, como alcaloides y sapogeninas.

Los investigadores en el suroccidente de Guatemala buscaron y colectaron 25 cultivares de ñame (*Dioscorea* spp.) en diversas alturas y zonas de vida. Se determinó que el manejo agronómico que los productores realizaban en el cultivo era rudimentario y escaso, sin fertilizaciones ni controles de plagas y enfermedades. Además, efectuaron una caracterizaron agromorfológica, evaluaron los materiales de ñame como espesante de salsas caseras y se establecieron un banco de germoplasma (Sánchez et ál. 2008).

Muluneh et ál. (2007) realizó un estudio en variedades criollas en el Sur de Etiopía comparándolas con las especies del Oeste de África; ya que poco se sabía de la diversidad e identificación de estas especies. Usando la técnica de AFLP en la diversidad genética de 48 accesiones de ñame de Etiopía, tales como *D. alata* L., *D. bulbifera* L., *D. cayenensis* L., y *D. rotundata* Poir. demostrando que son ampliamente diferentes al igual que hay diversidad en lo morfológico.

2.4 Importancia de los Bancos de Germoplasma y Recursos Fitogenéticos

Los bancos de germoplasma vegetal son centros de recursos para material vegetal vivo, cuya función principal es la de establecer y mantener colecciones de material vegetal de semillas, cultivo de tejidos, plantas en crecimiento activo y polen, entre otras. A los bancos de germoplasma también se les conocen como: Centros de Recursos Fitogenéticos. Los bancos no contienen todos los tipos de plantas, por el contrario, son especializados o selectivos, por ejemplo bancos de plantas medicinales, bancos de plantas forrajeras, entre otros.

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 germoplasma con las primeras conferencias internacionales sobre Recursos Fitogenéticos promovidas por la FAO (1967, 1973). Además, podemos mencionar que en estos bancos de germoplasmas establecidos se refleja una intensa actividad de distribución e intercambio de materiales (Franco s/f).

Según Cubillos (1994), citado por Campos y Seguel (1999) los recursos fitogenéticos constituyen una importante fuente de diversificación, generando nuevos productos y/o servicios agropecuarios, y se definen como aquellos materiales vegetales de uso actual o potencial en beneficio de la humanidad. Mientras que Frankel (1971), citado de igual forma por Campos y Seguel (1999), considera como recursos genéticos vegetales a las especies silvestres y primitivas de las plantas cultivadas, a las razas o variedades locales ("landraces"), a los cultivares obsoletos, a los cultivares modernos y los genotipos especiales.

La recolección de plantas silvestres para la preservación del germoplasma de la mayoría de los cultivos o plantas útiles al hombre, ha sido considerado como un gran esfuerzo que el hombre ha realizado en los últimos años, especialmente al darse cuenta que algunos problemas del campo no pudieron solucionarse en las colecciones de materiales mejorados. Esto se debió a que durante su proceso de domesticación, selección natural y con mayor razón durante la selección artificial o dirigida con objetivos bien claros, perdió la mayoría de características rústicas, tolerancia o resistencia a las enfermedades, amplia adaptación, etc. (Enríquez 1991, citado por López 1999).

La recolección de germoplasma es la etapa inicial del estudio de los recursos genéticos, sin embargo, posee un valor limitado si no se articula con una adecuada conservación, caracterización y posterior evaluación. Estas dos últimas etapas se consideran mucho más importantes en el caso de aquellas especies carentes de programas de mejoramiento genético desarrollados en el país. El desafío actual es coleccionar y caracterizar apropiadamente los recursos genéticos, posibilitando así el uso directo de su variabilidad genética en fitomejoramiento (Campos y Seguel 1999). Según FAO (1996) y Consejo Internacional Recursos Fitogenéticos (por sus siglas en inglés IBPGR (1986), citado por Malaurie (1998) existen 43 países con germoplasma de *Dioscorea*; y algunos de ellos cuentan con colecciones en bancos de germoplasma *in vitro* (Cuadro 1).

Cuadro 1. Países ¹ y zonas geográficas² con colecciones de germoplasmas de ñame

Europa	Antillas	América	Pacífico	Asia	África
Francia ²	Barbados *	Brasil ²	Islas Cook	Bangladesh	Bénin
Reino Unido ²	Cuba ²	Colombia	Fiji	India	Burkina Faso
	Guadalupe ²	Costa Rica	Islas Niue	Indonesia	Camerún
	Jamaica ²	Guatemala	Nueva Caledonia ²	Japón ²	Costa de Marfil ²
	Santo Domingo	México	Papua Nueva Guinea	Malasia	Ghana ²
	Trinidad y Tobago	Panamá	Guinea	Nepal	Nigeria ²
		Estados Unidos	Isla Salomón	Filipinas ²	Sudáfrica
			Tonga	Sri Lanka	Togo
			Vanuatu	Tailandia	Uganda
			Samoa Occidental ²	Viet Nam	

**in vitro* de mantenimiento para fines de producción.

¹ listado no exhaustivo (fuente confiables).

² colecciones *in vitro* (de acuerdo a fuentes confiables).

La FAO (2009) establece en la versión final del Segundo proyecto de informe sobre el estado de los recursos del mundo para la Alimentación y la Agricultura, que existen a nivel mundial un total de 16,446 accesiones concentradas mayormente en seis bancos de germoplasma. Los bancos de germoplasmas en donde se depositan los mayores porcentajes de accesiones fueron:

<i>Bancos de germoplasma</i>	<i>Ubicación</i>	<i>Porcentaje</i>
Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA)	Nigeria	20%
Universidad Nacional de Costa de Marfil (UNCI)	Costa de Marfil	9%
Universidad de Abomey Calavi (UAC)	Benin	7%
Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (PGRRI)	Roma	6%
Dodo Creek Estación de Investigación, Ministerio del Interior Natural y el Desarrollo (DCRS)	Islas Salomón	3%
Universidad Peradeniya (PU)	Sri Lanka	3%

2.5 Caracterización del germoplasma

2.5.1 Caracterización morfológica

Los caracteres morfológicos son muy usados en la identificación de especies, familias y géneros de plantas. Además, las características morfológicas y su etnobotánica han sido el tema de numerosos estudios en genética de poblaciones y agricultura, donde la resistencia a plagas y enfermedades y los rendimientos han sido factores importantes (Falconer 1981).

La descripción morfológica de órganos vegetativos y reproductivos y rasgos agronómicos clásicos han sido de gran utilidad para la caracterización y evaluación de recursos genéticos. Estos descriptores pueden ser definidos como atributos observables de la planta, y fácilmente cuantificables e identificables; por lo que pueden ser altamente heredables y permiten una discriminación rápida de fenotipos. Estos atributos son fácilmente observables y se expresan de la misma forma en cualquier ambiente; por ejemplo, la altura de la planta, el color de la hoja apical, días de floración y color de la flor; los rendimientos y la resistencia a enfermedades (Querol 1988, Demey et ál. 2003, Jiménez y Hernández 2009). Estas descripciones son limitadas por su dependencia del tipo de heredabilidad del carácter; es decir, si el carácter en estudio se hereda a través de poli genes, dominancia parcial o completa, así

como del tiempo necesario para la evaluación completa del cultivo la cual es necesariamente lenta, dado el gran número de caracteres que hay que observar (Demey et ál. 2003).

Teóricamente el número de datos que se pueden tomar durante la caracterización y la evaluación es infinito, pero una buena descripción de las plantas no está determinada por el número de variables descritas, sino por la utilidad práctica de las variables y su precisión. En la práctica, la toma de datos se ve limitada a características de importancia en el mejoramiento o para la utilización de la planta, que sean de utilidad para conocer la estructura poblacional de la especie (Querol 1988, López 1999).

Los descriptores de las plantas que pertenecen al género *Dioscorea* spp. están establecidos por características como: el tallo joven y maduro, las hojas jóvenes y maduras, la floración, el fruto, los tubérculos aéreos y subterráneos, etc. (IPGRI/IITA 1997). Los tipos de características para evaluar y caracterizar la diversidad genética son numerosos. Tradicionalmente se ha utilizado las variaciones morfológicas relacionadas especialmente con el hábito de crecimiento, tamaño, forma y color de la semilla. Esta variación es mayor en las formas cultivadas que en las formas silvestres (Querol 1988, López 1999).

En estudios realizados por Campos y Seguel (1999), la dificultad en diferenciar genotipos sólo con base en caracteres fenotípicos conlleva la conservación de numerosas accesiones duplicadas en los bancos de germoplasma. En términos prácticos esto reduce la eficiencia de manejo del germoplasma e incrementa los costos de mantención, regeneración, caracterización y documentación. Una alternativa al respecto es la detección de duplicados mediante marcadores moleculares, determinándose así si dos accesiones bajo sospecha son efectivamente idénticas o en sus defectos similares.

2.5.2 Caracterización molecular – Marcadores moleculares

Las variables, los caracteres o parámetros, que se han utilizado para observar y detectar la variabilidad presente en los seres vivos, son numerosas. Los marcadores genéticos son una clase de éstos y, con ellos, se espera que reflejen la variabilidad existente entre los individuos o poblaciones de estudio (López 1999).

Desde el descubrimiento de la metodología base del primer marcador molecular se impulsaron investigaciones, que han llevado al desarrollo de nuevas técnicas y modificaciones en otros marcadores para mejorar los análisis y los resultados. Según Phillips (1998), la cronología de los principales marcadores de ADN usados actualmente inició en 1970 con la digestión del ADN con enzimas de restricción (Cuadro 2).

Becerra y Paredes (2000) señalan que la investigación del polimorfismo con el desarrollo de las tecnologías de biología molecular basadas en ADN, se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores, aquellos basados en Fragmentos de Restricción Polimórficos (RFLP) y en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Esta última técnica ha derivado en múltiples técnicas como son la Amplificación de ADN al Azar (RAPD), Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (Cuadro 3).

Cuadro 2. Cronología de los principales marcadores de ADN usados actualmente

<i>Marcador</i>	<i>Metodología base</i>	<i>Año de origen</i>
RFLP (Restriction Fragment length Polymorphism)	Digestión con enzimas de restricción, “Southern transfer”, “Nick translation”	1970
PCR (Polimerase Chain Reaction)	Amplificación de segmentos de ADN mediante la acción de la enzima de polimerasa	1985
RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)	PCR	1991
Microsatélites o SSR (Simple Sequence Repeats)	PCR	1992
AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)	PCR + RFLP	1993

Fuente: Phillips (1998).

El uso de las técnicas usadas con marcadores moleculares como: PCR, AFLP, RAPD, RFLP, etc., permiten construir mapas de ligamiento genético cada vez más completos y precisos, en donde se pueden identificar posiciones en los cromosomas que están relacionadas con características de importancia agronómica; ya sea, mono o poligénicas, como es la

resistencia a enfermedades, la producción, la calidad, etc. esto permite en etapas posteriores, la selección precoz de organismos y la ubicación y selección de genes de interés (Phillips 1998).

Cuadro 3. Eficiencia de algunos marcadores moleculares

<i>Marcador</i>	<i>Cantidad de datos polimórficos (puntos/reacción)</i>	<i>Resolución del mapa (marcadores colocados por genoma)</i>	<i>Tipo de marcador</i>
RFLP	1-2	1.000	Codominante
RAPD	4-6	10.000	Dominante
Microsatélites	3-10	10.000	Codominante
AFLP	10-50	Más de 100.000	Dominante/ Codominante

Fuente: Phillips (1998).

Las ventajas de la caracterización de ADN son: a) no es influenciada por el medio ambiente; b) cualquier parte de la planta y en cualquier estado de crecimiento, puede ser utilizada, excepto para isoenzimas; c) el análisis es ilimitado; d) se requiere de pequeñas cantidades de tejido; e) el ADN es muy estable; f) según la técnica se puede detectar alto polimorfismo; g) según la técnica puede estar distribuido en todo genoma (Powell 1992, Rao y Riley 1994, citado por López 1999).

2.6 Tecnología de Fragmento Amplificado Longitud Polimórfico (AFLP)- Metodología

La técnica de AFLP es la combinación de los principios de RFLP y PCR, donde una sub muestra de fragmentos producidos por la restricción del ADN en estudio es amplificada selectivamente. Los AFLP usan como partidores oligonucleótidos complementarios a las secuencias que han sido ligadas a cada extremo del ADN digerido. El polimorfismo es detectado por la presencia o ausencia de fragmentos y son normalmente de herencia dominante (Vos et ál. 1995).

Para Baginsky (s/f), el AFLP es una técnica basada en una selectiva ampliación por PCR de fragmentos de restricción obtenidos de un ADN digerido; con elevado número de

polimorfismo y gran poder de detección de variabilidad genética; no requiere de conocimiento previo del organismo o especie que se estudia; requiere poca cantidad de ADN. Es un método muy sensible y se utiliza para visualizar polimorfismo de ADN entre las diferentes muestras de un germoplasma, con el fin de generar mapas de ligamiento.

Según Tohme et ál. (1996), citado por Becerra y Paredes (2000), el procedimiento comienza con la digestión del ADN genómico de los individuos con enzimas de restricción que reconocen 4 y 6 bases de reconocimiento, lo cual genera fragmentos de tamaño preferentemente pequeño. Luego se ligan adaptadores de secuencia conocida a cada extremo y para el proceso de amplificación se usan partidores o sebadores complementarios a estos adaptadores, manteniendo el sitio de restricción más un cierto número de nucleótidos (3 generalmente) que deben agregarse al extremo 3'. Finalmente, el proceso implica tres alternativas de detección de las bandas, la primera es la marcación radioactiva de los productos amplificados en la última etapa de amplificación, su separación en geles de poliacrilamida, secado del gel y su visualización en autoradiografías. La segunda alternativa usa la tinción directa del gel con nitrato de plata. La tercera implica el uso de sebadores marcados con fluorocromos que pueden ser excitados por un laser y detectados por un equipo automatizado. Los resultados entre ambas alternativas son comparables, siendo la segunda de menor costo y fácil aplicación. Una de las mayores ventajas de esta técnica es que en una sola reacción se puede identificar alrededor de 50 fragmentos o *loci* en un tiempo corto.

El procedimiento para la aplicación de la técnica de AFLP consta de 4 pasos según Baginsky (s/f) como:

1. Digestión del ADN con dos enzimas de restricción (*EcoR1/Mse1*).
2. Incorporación de adaptadores de oligonucleótidos específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática.
3. Amplificación selectiva vía PCR de una fracción de los fragmentos de ADN generados utilizando primer específicos diseñados para reconocer la secuencia en los adaptadores.

4. Detección del polimorfismo verificado en geles de poliacrilamida. Se visualizan directamente con nitrato de plata o se marcan radioactivamente los productos amplificados para luego observarlos en geles de poliacrilamida mediante autoradiografía.

2.7 Ventajas y desventajas de los AFLP

La técnica de AFLP requiere de una buena calidad de ADN para el proceso de digestión con enzimas de restricción, que proporciona un resultado más preciso en el proceso de amplificación (Becerra y Paredes 2000). Entre las ventajas destacadas de los AFLP podemos citar que no requieren del conocimiento previo del genoma; tienen un número ilimitado de marcadores; poseen un polimorfismo elevado y se puede tener un resultado que refleja todo el genoma. Son muy reproducibles y versátiles por las distintas enzimas e iniciadores selectivos. Mientras que las desventajas que podemos destacar de esta técnica es que son de herencia dominante; tienen bajo contenido de información genética por locus, siendo una técnica medianamente laboriosa y muy costosa.

Según Phillips (1998), una de las desventajas de esta técnica es que la preparación de los geles de acrilamida requiere de gran destreza, además de que es una sustancia muy tóxica. Las ventajas son la gran cantidad de bandas que genera y la relativa facilidad con que se realizan, sobre todo considerando que hay *kits* completos actualmente; y son ideales para determinar identidades varietales y detección de plantas fuera de tipo.

2.8 Estudios realizados en *Dioscorea spp.*

El ñame actualmente es ampliamente cultivado en muchas partes del mundo, y esto hace que su papel sea fundamental en la subsistencia de muchas áreas rurales de algunos países. Por su importancia antes mencionada, y por su creciente demanda a nivel mundial como producto de exportación; podemos mencionar algunas investigaciones con base en las caracterizaciones morfológicas y moleculares de gran importancia realizadas hasta la fecha.

2.8.1 Estudios morfológicos y moleculares en *Dioscorea* spp.

La diversidad morfológica de 45 accesiones de ñame Guinea (*D. cayenensis* y *D. rotunda* Poir.), fue determinada con el uso de los descriptores del IPGRI. Se clasificaron en seis grupos de cultivares basándose en las similitudes morfológicas, proponiendo una clave para la identificación de los grupos de cultivares. Seis sistemas enzimáticos (6PGD, IGP, AAT, SKDH, PGM, EST) se utilizaron también para evaluar la variación genética de los ñames cultivados. Con la investigación se identificaron veintiocho genotipos de las 45 accesiones analizadas, y se observó que los agrupamientos morfológicos y enzimáticos eran muy cercanos a los obtenidos morfológicamente (Mignouna et ál. 2002).

González (2003), caracterizó 6 genotipos del banco de germoplasma del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP), mediante características cuantitativas. El análisis morfológico permitió identificar niveles de variabilidad entre los seis genotipos, considerados de interés económico. Se identificaron 11 características morfológicas cuantitativas que permitieron diferenciar a los seis cultivares de ñame del IDIAP en tres grupos. La caracterización molecular se realizó con 37 genotipos (quince del IDIAP y veintidós del CATIE), y se usaron marcadores moleculares RAPD, los cuales permitieron estimar las distancias genéticas presentes en los 37 genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida*. Se observó claramente la separación de los genotipos de la colección del CATIE y del IDIAP. Los genotipos de la colección del CATIE se dividen en dos grupos, uno de los cuales presenta una estructura de grupo y el otro subgrupo no presenta una estructura de grupo definida.

Bustamente et ál. (2003), utilizó muestras de la colección de ñame (*Dioscorea* spp.) de la Universidad de Córdoba y algunas muestras provenientes del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), con la finalidad de caracterizarla molecularmente y complementar la información que se tiene de ellas. Los estudios iniciaron empleando técnicas como el AFLP, se utilizaron oligonucleótidos aleatorios que generaron patrones de bandeo característico de cada individuo. Se encontró que la diversidad de la población fue de 0.0413 con una media similar de 0.9587, indicando la poca diversidad genética, y esto explica la vulnerabilidad a plagas y enfermedades.

En estudios realizados por Mignouna et ál. (2003), se planteó que existen técnicas que pueden caracterizar genéticamente la planta, pero que en la caracterización del germoplasma de ñame aún no están definidas. Sus estudios se basaron en determinar la eficiencia de técnicas como RAPD, AFLP y SSR para evaluar relaciones genéticas, identificar y discriminar variedades de cultivares de ñame. Los resultados indicaron que cada una de las tres técnicas puede identificar cada cultivar, pero cada técnica difiere en el denominado índice genético (IG), que es el valor del genotipo para los caracteres considerados. El estudio mostró que el índice genético para los marcadores moleculares son: AFLP (IG= 2.56), SSR (IG=0.39) y RAPD (IG=0.35). El AFLP mostró la mayor eficiencia de la detección de polimorfismo genético.

Asha et ál. (2006), evaluó la interrelación entre los rasgos morfológicos y moleculares mediante el análisis de RAPD de 12 especies de *Dioscorea* spp. con el uso 14 iniciadores decameron. Se presentaron 133 productos amplificados con alto polimorfismo mostrando un grado de variabilidad genética entre las especies de *Dioscorea*. El agrupamiento dio como resultado la formación de dos grupos formados por 9 especies de las 12 estudiadas y *D. bulbifera* se mantuvo separado, destacando la distancia genética entre ellas.

Las colecciones de ñame de África Occidental se caracterizaron utilizando la lista de descriptores estándar para este cultivo. Para evaluar el alcance de la diversidad y desarrollar una colección núcleo se emplearon 77, de los 86 descriptores junto al índice de diversidad de Shannon-Weaver. La colección núcleo se compone de 391 accesiones que representan seis especies cultivadas y dos silvestres (*D. taxones*). Se comprobó la conveniencia del procedimiento comparando la media y la distribución de diversidad de 11 caracteres cuantitativos, explicando así, la importancia de este estudio (Mahalakshmi et ál. 2007). Finalmente, Bousalem et al. en el 2010 publicaron las relaciones que existían por medio de AFLPs entre *D. trifida* y sus formas silvestres.

Estudios técnicos analizados entre el Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA), agricultores de Bariba, Nago y Fon, la Universidad de Bénin en colaboración del Instituto de Investigación para el Desarrollo de Francia (IRD, por sus siglas en francés), el Instituto Nacional de Investigación Agrícola de Benin (INRAB, por sus siglas en francés) y Centro de Cooperación Internacional en Investigación Agronómica para el Desarrollo

(CIRAD, con sus siglas en francés) – Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA, por sus siglas en inglés) (YRCU) con caracterización morfológica y genética en las variedades cultivadas y domesticas, demuestran que de unos 68 ñames recién domesticados poco menos de una cuarta parte son muy similares a las variedades existentes. Del resto, la mitad fueron similares pero no idénticos a algunas razas y la otra mitad era completamente diferente. Esto confirma que la domesticación hace una contribución significativa a la diversidad genética del sistema de ñames de los productores agrícolas (Bioversity et ál. 2008).

2.9 Relación entre la caracterización morfológica y molecular

La caracterización molecular ofrece una mayor diversidad genética. Estudios previos muestran las relaciones entre las caracterizaciones morfológicas y moleculares, y ofrecen información que puede ser considerada complementaria; ya que no se origina un patrón único de asociación entre las entradas e indican que la similitud fenotípica necesariamente no es producto de la similitud genotípica, sino a que un diferente pool de genes pueden generar fenotipos similares (Demey et ál. 2003).

Según Wilson et ál. (1974, 1977) y Hillis y Moritz (1990), citados por Demey et ál. (2003) se ha demostrado que las caracterizaciones generadas a través de descriptores morfológicos y marcadores moleculares suelen ser independientes, respondiendo en cada caso a presiones evolutivas diferentes. Sin embargo, en general, estudios que incorporen descriptores morfológicos y marcadores moleculares proveerán una mejor descripción e interpretación de la diversidad genética de los individuos.

Según Phillips (1998), características como: utilidad, efecto del medio ambiente, edad de la planta a analizar, tipo de material vegetal, entre otros marcan claramente algunas diferencias entre los tipos de marcadores morfológicos y moleculares (Cuadro 4).

Cuadro 4. Principales diferencias entre marcadores morfológicos y moleculares

<i>Características</i>	<i>Morfológicas</i>	<i>Moleculares</i>
Utilidad	Restringida a pocas plantas/modelos para estudios genéticos	Todas
Cantidad disponible	Escasos y con baja probabilidad de encontrar asociaciones significativas con caracteres de importancia económica	Cantidad ilimitada de polimorfismo
Efecto del medio ambiente	Fuerte	Nulo
Efecto del marcador	A veces es indeseable	Neutro
Edad de la planta a analizar	Normalmente en estado adulto	Desde los primeros estados de desarrollo e incluso a partir de semillas o estados embrionarios
Tipo de material vegetal	Usualmente toda la planta	Células o toda la parte de la planta
Efectos epistáticos	Son factibles	Aparentemente no hay

Fuente: Phillips (1998).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Fase de Campo

3.1.1 Localización del estudio

Las plantas para la caracterización morfológica fueron sembradas en Cabiria (El Encierro), CATIE, Turrialba, República de Costa Rica. Cabiria se ubica a 9° 54' de Latitud Norte, 83° 40' Longitud Oeste, a una altura de 625 msnm. La precipitación media anual es de 2600 mm, y la temperatura media anual es de 22 °C. La caracterización se realizó desde el mes de marzo hasta octubre 2010.

3.1.2 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica se trabajó con una lista de 60 caracteres definidos por el IPGRI/IITA (1997). Dicha caracterización se realizó en 59 accesiones de materiales procedentes del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE en Turrialba, Cartago, Costa Rica (Anexo 1).

3.1.3 Material experimental

Se evaluaron 59 accesiones de *Dioscorea* spp. (5 plantas por accesión) del inventario del banco de germoplasma (Cuadro 5), de las cuales 17 son *Dioscorea alata*, 2 de *Dioscorea bulbifera*, 1 de *Dioscorea cayensis*, 1 de *Dioscorea dumetorum*, 1 de *Dioscorea esculenta*, 2 de *Dioscorea pentaphylla*, 23 de *Dioscorea* sp. y 6 de *Dioscorea trifida* (Figura 1).

3.1.4 Manejo agronómico

Para la obtención del material de semilla, se seleccionaron tubérculos pequeños y sanos, libres de nematodos y enfermedades, y con una buena madurez al momento de la cosecha. Dichos tubérculos procedían de la cosecha del año 2009 y fueron puestos a secar en un invernadero hasta el rompimiento de su latencia. Una vez brotados, se sembraron en el campo, siguiendo algunas recomendaciones para este cultivo.

Cuadro 5. Accesiones de *Dioscorea* spp. de la colección del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) utilizadas para el estudio

Accesión	Género	Especie	Procedencia	Fecha de introducción
6319	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6322 A	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6322 B	<i>Dioscorea</i>			
6322 C	<i>Dioscorea</i>			
6323	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6324	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6327 A	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6327 B	<i>Dioscorea</i>			
6328	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6344	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6346	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6347	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6348 A	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6348 B	<i>Dioscorea</i>			
6348 C	<i>Dioscorea</i>			
6569	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Honduras	01/03/1977
6664	<i>Dioscorea</i>	<i>esculenta</i>	Puerto Rico	01/04/1977
6670	<i>Dioscorea</i>	<i>pentaphylla</i>	Puerto Rico	01/04/1977
6674	<i>Dioscorea</i>	<i>dumetorum</i>	Puerto Rico	01/04/1977
6678	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/04/1977
7059	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/06/1977
7060	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Desconocido	01/06/1977
7064	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Barbados	01/06/1977
7066	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Desconocido	01/06/1977
7067	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Desconocido	01/06/1977
7079	<i>Dioscorea</i>	<i>cayenensis</i>	Guadaloupe	01/06/1977
7088	<i>Dioscorea</i>	<i>bulbifera</i>	Estados Unidos	01/06/1977
7231	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Panamá	01/07/1977
7248	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Panamá	01/07/1977
7291	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Panamá	01/07/1977
7297	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7299	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7305	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977

Cuadro 5 (Cont.). Accesiones de *Dioscorea* spp. de la colección del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE) utilizadas para el estudio

Accesión	Género	Especie	Procedencia	Fecha de introducción
7311	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7332	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7333	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7356	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7363	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Panamá	01/07/1977
9476	<i>Dioscorea</i>	<i>pentaphylla</i>	Puerto Rico	01/12/1978
10009	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/11/1979
10715 A	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Panamá	01/01/1980
10715 B	<i>Dioscorea</i>			
10718	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
10722	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
10727	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
10733	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Panamá	01/01/1980
10739	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
11425	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Guatemala	01/04/1980
11684	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Desconocido	01/04/1980
11685	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Desconocido	01/04/1980
11690	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Desconocido	01/04/1980
11693	<i>Dioscorea</i>	<i>trifida</i>	Desconocido	01/04/1980
11735	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Costa Rica	01/06/1980
12174	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Honduras	01/12/1980
12451	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
12460	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
12470	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
13175	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/11/1981
13312	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/02/1982

Fuente: Solano (2009) modificado por Aguilar (2010).



Figura 1. Accesiones de *Dioscorea* spp. creciendo en campo para caracterización morfológica.

- Siembra en los meses de abril-mayo, al momento de la germinación.
- Establecimiento de camellones: se confeccionaron surcos de 1 m entre lomillos y 0.60 m entre plantas; de manera que las plantas crecieran con una buena aireación, y así impedir el exceso de humedad para evitar el desarrollo o foco de enfermedades. Se construyó una estructura de soporte para amarrar la parte aérea de la planta, una vez iniciado el desarrollo vegetativo. De cada una de las accesiones se sembraron 5 plantas, distribuidas bajo un diseño completamente aleatorizado.
- Aplicación de fertilizante: se aplicó de acuerdo a los resultados del análisis de suelo. Para ello, se hizo una aplicación al momento de la siembra con la fórmula 10-30-10, para un mejor aprovechamiento del fósforo. A los 22 días de brotado, se aplicó una fertilización nitrogenada con Urea (46% de nitrógeno), mientras que a los 3 y 4 meses después de establecido en campo, se aplicó la fórmula 18-5-15-6-2.
- Aporque y tutoreo: Al inicio de la formación de los tubérculos se realizó una aporca a cada planta y se colocaron tutores para ayudar al desarrollo vegetativo en su hábito trepador.

- Control de malezas: se realizó la limpieza con guaraña sin dejar expuesto el suelo para evitar lavado por las lluvias.
- Aplicación de insecticidas: se aplicó Mirex (Sulfloramida 3%) para el control de las hormigas arrieras (*Atta* sp.).

3.1.5 Caracterización de cultivares, descriptores y registro

Para la caracterización de cultivares, se utilizó la lista de Descriptores Morfológicos del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, (IPGRI por sus siglas en inglés) para ñame (*Dioscorea* spp.) por ser un sistema de caracterización normalizado y promovido a nivel mundial (IPGRI/IITA 1997) (Anexo 1).

Esta metodología permite discriminar fácil y rápidamente entre fenotipos. Generalmente son caracteres heredables, y pueden ser fácilmente detectados a simple vista; ya que se expresan igualmente en todos los ambientes (IPGRI/IITA 1997).

La lista de descriptores para caracterizar la planta de ñame es de 155 (IPGRI 1997), y para el estudio se utilizaron sólo 60 descriptores, que corresponden a las características de desarrollo vegetativo de tallo, hojas, floración, fruto, tubérculos aéreos y subterráneos. Las 60 características a evaluar se dividieron en 23 características cuantitativas y 37 cualitativas codificadas por medio de asignación de números indicadores para cada categoría (Anexo 1). Los datos de caracterización se iniciaron a registrar partir del mes de enero hasta octubre de 2010.

3.2 Fase de laboratorio

3.2.1 Capacitación

La capacitación en los marcadores moleculares de AFLP se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR), San José, Costa Rica.

3.2.2 Localización del estudio

La caracterización molecular se llevo a cabo en las instalaciones del laboratorio de Electroforesis y PCR del Centro de Investigación de Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica (UCR).

3.2.3 Técnica para la caracterización molecular

Se utilizó la técnica de Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP por sus siglas en inglés), por medio de la reacción en cadena de la polimerasa en las accesiones de ñame. Esta técnica se utilizó para caracterizar genéticamente cada una de las accesiones de ñame y determinar si hay o no variabilidad genética entre ellas.

3.2.4 Material experimental

El material experimental consistió en algunos casos de hojas de plántulas procedentes de cultivo *in vitro* y plantas provenientes del ensayo de campo. Para la extracción del ADN, las hojas deben ser tiernas y sanas preferiblemente (Albertazzi com. pers.).

3.2.5 Extracción de ADN

El aislamiento del ADN se realizó siguiendo el protocolo de extracción de ADN por el método de CTAB-2X de (Doyle y Doyle 1987), modificado por Villalobos (2011) (Anexo 2).

3.2.6 Determinación de la concentración de ADN

Para la determinación de la concentración del ADN, se utilizó el método de electroforesis en gel de agarosa y el de espectrofotometría para comparar resultados.

3.2.6.1 Método con Gel de Agarosa

La medición de la concentración del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, y para cuantificar la concentración del ADN se usó el marcador Gene Ruler (Fermentas) de 1Kb.

3.2.6.1 Método con espectrofotometría

Para la cuantificación de la cantidad de ADN se hicieron lecturas en longitudes de onda de 260 nm, lo cual permitió el cálculo de las concentraciones de los ácidos nucleicos de las muestras. Una OD = 1 corresponde aproximadamente a 50 µg/ml para una doble cadena de ADN, 40 µg/ml para una cadena simple de ADN (Valadez y Kahl 1997).

El ratio entre las lecturas a 260 y 280 nm (OD₂₆₀/OD₂₈₀) proporcionó un estimado de la pureza del ácido nucleico. Las preparaciones puras de ADN deben mostrar valores para esta relación de 1.8 a 2.0 respectivamente (Sambrook et ál. 1989).

Para el cálculo de la concentración de ADN en la solución se debe utilizar la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de ADN } (\mu\text{g}/\mu\text{L}) = [DO_{260} \times 100 (\text{factor de dilución}) \times 50 \mu\text{g}/\mu\text{L}] / 1000$$

3.2.7 Purificación del ADN

La purificación del ADN consistió en eliminar el ARN del ADN extraído en cada una de las muestras, utilizando RNase A con una concentración de 10 µg/ml.

3.2.8 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación del ADN con la técnica de AFLP

La reacción en cadena de polimerasa (PCR) para la técnica de Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (AFLP), consistió en cuatro etapas consecutivas para llegar a la amplificación. Los reactivos o kits utilizados fueron: AFLP® Analysis System I y AFLP® Starter Primer. Las tres primeras etapas (digestión, ligación y preamplificación) se realizaron una sola vez (Anexo 5). El ADN genómico fue digerido por la combinación de enzimas de corte raro (*EcoRI*) y de corte frecuente (*MseI*), ligado con la solución adaptadora y la enzima T4 ligasa. En la preamplificación el producto obtenido de la digestión/ligación se diluyó, agregándole cebadores específicos de una base *EcoRI*+A y *MseI*+C para la preamplificación selectiva. Con el producto diluido de la preamplificación se añadieron cebadores específicos de tres bases selectivas, ejemplo: *EcoRI*+AGC y *MseI*+CAC. Por lo

general, los reactivos para preparar las mezclas indican las cantidades para una reacción, entonces esta cantidad deberá multiplicarse en función del número de reacciones o genotipos que sean objeto de estudio (Vos et ál. 1995).

3.2.9 Visualización del Polimorfismo de Longitud de Fragmentos Amplificados

El ADN amplificado es desnaturizado con formamida por 5 minutos a 93°C y enfriado en hielo antes de colocarlo en el gel de acrilamida al 4% para la separación de fragmentos amplificados por electroforesis en condiciones desnaturizantes por dos o tres horas. Para el revelado se usó el método de tinción de plata, visualizando los patrones de AFLP para su lectura de forma visual. Las bandas polimórficas se evalúan de forma binaria.

3.2.9.1 Combinaciones propuestas para la amplificación del ADN

Se seleccionaron 11 combinaciones enzima/primer mostrados en el Cuadro 6 en base a los resultados de los estudios reportados por Malapa et ál. (2003), Mignouna et ál. (2002) y otros por medio de screening utilizando las accesiones 6347, 6670, 7066, 11425 y 13312 presentando el mayor número de bandas polimórficas.

Cuadro 6. Combinaciones utilizadas en el screening para seleccionar mayor polimorfismo

<i>N° Combinación</i>	<i>Combinaciones propuestas</i>
1	E- AGC / M- CAC ²
2	E- AGC / M- CAA ²
3	E- AGC / M- CAG ²
4	E- AGC / M- CAT ²
5	E- AAC / M- CAG ¹
6	E- AAC / M- CAT ¹
7	E- ACA / M- CAG ¹
8	E- ACC / M- CAT ¹
9	E- ACT / M- CAC ^o
10	E- AAG / M- CAG ²
11	E- ACA / M- CAT ¹

Fuente: ^oMignouna et ál. 2002, ¹ Malapa et ál. (2003) y ² screening

3.3 Análisis estadístico

Los datos obtenidos de la caracterización morfológica se analizaron por medio del programa InfoStat/Profesional versión 2009. Para los descriptores morfológicos se realizó el

análisis descriptivo. En el caso de los descriptores cuantitativos se usaron medidas de resumen como media, varianza, coeficiente de variación, valor mínimo y valor máximo, mientras que para los cualitativos se confeccionaron tablas de frecuencias.

Las variables consideradas en este estudio fueron 60 descriptores morfológicos para el ñame propuestos por IPGRI/IITA (1997), que se dividieron en *cuantitativos* y *cualitativos*. Algunos descriptores no estaban completos en las accesiones; por lo que se clasificaron como *completos* e *incompletos* (esta clasificación es para el uso de los análisis estadísticos). Los incompletos son aquellos descriptores que por la fenología de la planta no estaban presentes para su evaluación, por ejemplo características de la flor, el fruto, tubérculos aéreos.

Se confeccionó una base de datos identificando las variables en continuas, discretas, ordinales y nominales con la valoración de los descriptores cuantitativos y cualitativos. Por último, se obtuvo una base de datos resumida considerando el promedio para las cinco repeticiones por cada accesión con las variables continuas, discretas y ordinales; mientras que la moda se utilizó como medida resumen en las variables nominales.

Para realizar el análisis de conglomerados fue necesario transformar a variables binarias (0 y 1) las variables cualitativas; por medio de la creación de las variables auxiliares (Dummy).

La agrupación de genotipos según su parecido fenotípico se hizo mediante el análisis de conglomerados con método de Ward y la distancia Euclidiana para los descriptores cuantitativos, y con Jaccard para descriptores cualitativos. La distancia de Gower se utilizó para la mezclas de variables. Para validar la formación de grupos con descriptores cuantitativos se usó el MANOVA y la técnica de comparación de vectores medios DGC multivariada. El análisis discriminante lineal se utilizó para determinar cuál de los descriptores morfológicos cuantitativos caracterizan o separan los grupos de genotipos formados previamente por el análisis de conglomerados. Los grupos formados con variables cualitativas fueron validados mediante el uso de tablas de contingencia, usando el estadístico Chi-cuadrado máximo verosímil.

La agrupación de genotipos por su expresión genotípica, se basó en los datos obtenidos del análisis de marcadores moleculares; y se construyeron dendrogramas, usando el análisis de

conglomerados con distancias obtenidas a partir de la similitud de Jaccard y el método de Ward o UPGMA (encadenamiento promedio).

Para realizar los agrupamientos de genotipos con base en sus descriptores morfológicos y moleculares conjuntamente, se utilizó el análisis de conglomerado con la distancia construida a partir de la similitud de Gower y el método de Ward. Posteriormente, mediante un análisis de Procrustes generalizado con el ordenamiento morfológico y molecular, se obtuvo el consenso entre estos dos ordenamientos.

Se usó el árbol de recorrido mínimo para visualizar la filogenia a partir del parecido de las accesiones tanto en lo molecular como en lo morfológico; mediante el análisis de coordenadas principales. Además, se analizó la distancia genética e índice de diversidad de Nei y Shannon, la varianza molecular, junto a las coordenadas principales con el Programa Gen Al Ex ver 3.0.

Para determinar significancias estadísticas entre los grupos formados se empleó un ANOVA con gDGC multivariado o Hotelling como medida de comparación de vectores de medias.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Caracterización morfológica

4.1.1 Comportamiento biológico de la población para la caracterización morfológica

Durante el primer período en la toma de datos se presentaron inconvenientes para el establecimiento de las plantas en campo. Se observaron problemas como: poca altura de las parcelas y encharcamiento del agua lluvia entre ellas, impidiendo el buen desarrollo de las plantas y produciendo focos de enfermedades, así como el ataque de hormigas arrieras en algunas accesiones ubicadas a los bordes (Figura 2).

Según análisis realizado por el Dpto. de Fitopatología del CATIE, el resultado fue la presencia de un complejo de hongos a nivel de follaje y algunos tallos, formado por: *Colletotrichum dioscoreae*, *Cercospora* spp., *Didymosphaeria donacina*, *Phyllosticta dioscoreae* y *Ramolaria dioscoreae*, en las accesiones: 6319, 6323, 6324, 6346, 7088, 7248, 7311, 7332, 7333, 7363, 10009 y 10722. Estos problemas fitosanitarios provocaron la pérdida completa de algunas accesiones susceptibles, no obstante, algunas otras accesiones contaron con duplicado en invernadero lo que permitió su establecimiento en campo.

Una investigación realizada por Rivas-Platero y Chavarría (1997) con 14 accesiones del banco de germoplasma del CATIE, algunas de las cuales fueron utilizadas en este ensayo, mostró que las accesiones: 7064, 7066, 11693, 7363, 7248, 7231, 12451, 11735, 6328, 7059, 14329, 11685, 7390 y 11684 son moderadamente resistentes a las infestaciones con antracnosis (*Colletotrichum* spp.), mientras que las accesiones: 11693 y 11684 son susceptibles a virus del mosaico del ñame (Yam Mosaic Virus, con sus siglas en inglés, YMV). Las accesiones 11685, 7248, 7231, 7066, 11735, 14329, 7064, 7363, 7059, 6328, 12451 y 7390 resultaron ser moderadamente resistentes al ataque del virus antes mencionado. Las accesiones 7363 y 7248 mostraron susceptibilidad a la enfermedad en el presente trabajo, a pesar de haber sido consideradas moderadamente resistentes en el estudio previo. Las accesiones que estos autores habían considerado moderadamente resistentes y que en este estudio fueron susceptibles pudieron presentar estas enfermedades debido a condiciones

climáticas extremas favorables al desarrollo de las enfermedades (las condiciones de humedad debido a precipitaciones fueron superiores a los promedio encontrados en Turrialba). La precipitación total mensual para los meses de abril a junio, 2010 se incremento de 129.3 mm a 280.7 mm (CATIE 2011).



Figura 2. A. Primera siembra. B. Retención de agua lluvia en el cultivo. C. Presencia de enfermedades en la accesión 7305. D. Ataque de hormigas arrieras (*Atta* sp.) a la accesión 6319

El segundo periodo de toma de datos se planificó previo a la siembra para corregir algunos de los problemas detectados en el primer ensayo. Entre las mejoras presentadas estaban: formación de camellones de por lo menos 1.20 m de altura, 1 m de distancia entre hileras y 0.60 m de distancia entre plantas. Para el segundo ensayo no se observó el ataque de hormigas arrieras y las enfermedades se presentaron en las mismas accesiones pero con menor severidad.

Los resultados de la caracterización morfológica permitieron determinar el grado de diversidad entre las 59 accesiones de ñame en estudio. Los descriptores morfológicos cualitativos y cuantitativos permitieron discriminar entre genotipos y el establecimiento de grupos de accesiones afines.

Es importante destacar que hubo diferencia entre los periodos de latencia y germinación entre las diferentes accesiones; de igual modo, algunas accesiones llegaron a producir flores, tubérculos aéreos y formación de frutos, no obstante, esta respuesta no se manifestó en todas las accesiones durante la época de muestreo, lo que imposibilitó la toma de datos de dichas características (Figura 3). Según Rouanet (1969) citado por Montaldo (1991), estableció que la precocidad de brotación de diversos ñames comestibles se dio en el siguiente orden: *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. trifida* y *D. alata*; mientras que para Montaldo (1991) la floración es muy escasa en casi todas las especies cultivadas, así como la formación de tubérculos aéreos, sólo se presenta en algunas especies. Ésta respuesta puede estar asociada con el hecho de que no todas las especies producen flores (*D. trifida* y *D. bulbifera*); y las demás especies alimenticias tropicales no producen regularmente semillas (Montaldo 1991).

CATIE cuenta con 63 accesiones de ñame y si bien el objetivo del presente trabajo fue evaluar la mayor cantidad posible de accesiones, sólo fue posible catacterizar 59 accesiones debido a la limitad disponibilidad de material. Los descriptores para tubérculo, sugeridos por el Manual del IPGRI (1997) no fueron evaluados debido a la poca cantidad de material disponible, como por ejemplo: espesor de la piel del tubérculo, color de la piel del tubérculo (debajo de la corteza), dureza del tubérculo (cuando se corta con un cuchillo), color de la pulpa en la sección transversal del centro, color de la pulpa en la parte inferior del tubérculo, uniformidad del color de la pulpa en la sección transversal (de la corteza al centro), textura de la pulpa, tiempo de oxidación de la pulpa después de cortada, color de la oxidación de la pulpa, cantidad de resina expulsada por el corte del tubérculo y capacidad del tubérculo cortado para provocar escozor en la piel humana (cuando se lo refriega sobre el brazo) los cuales requieren de la destrucción del material. Otros descriptores presentes en el manual del Manual del IPGRI (1997) fueron evaluados de manera incompleta, debido a que como se menciona anteriormente, no todas las accesiones presentan todos los estados fenológicos.

Estos problemas generan bases de datos incompletas lo cual restringe el uso de algunos métodos multivariados. La mayor parte de estos métodos requieren de un vector de observaciones completo, que implica tener datos para todos los descriptores en cada accesión (Johnson y Wichern 1998). Por este motivo, a partir de la base de datos incompleta se construyeron bases de descriptores completos para realizar los análisis multivariados.



Figura 3. Características incompletas evaluadas. A. Floración. B. Tubérculos aéreos

4.1.2 Análisis descriptivo de la población

En las secciones de tallo (joven y maduro) y hoja (joven y madura) se registraron 10 descriptores: días de brote, longitud del tallo joven, número de entrenudos del tallo joven, número de tallos maduros por planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo maduro, longitud de los entrenudos en el tallo maduro, número de hojas jóvenes y número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas. Los que presentaron mayor variabilidad fueron: número de entrenudos hasta la primera ramificación (CV 275.90), número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas (CV 171.87) y número de hojas jóvenes (CV 115.01); mientras que los que representaron la menor variabilidad fueron: diámetro del tallo maduro (CV 25.93) y longitud de los entrenudos en el tallo joven (CV 31.83) (Cuadro 7). Según González (2003) estas variables tienen altos niveles de significancia menores a 0.05 en el análisis de varianza de su estudio.

Se registraron cuatro variables cualitativas en el tallo joven y sus diferentes grados de expresión (Cuadro 8). Se destaca la presencia de alas en el tallo joven (54%) y la ausencia de pelos en el tallo joven en el 54% de las accesiones. El color predominante del tallo joven es el verde amarillo y la presencia de espinas en el tallo es poco frecuente. La mayoría de las

accesiones en estudio corresponden a *D. alata*; según Montaldo (1991) esta especie tiene tallos fuertemente alados, sin espinas y verdes.

Cuadro 7. Estadísticas descriptivas para las variables cuantitativas completas en tallos y hojas de las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

Variables	N° de observaciones	Promedio	Desviación estándar	Coefficiente de variación	Valores mínimos	Valores máximos
Días de brote	59	15.41	15.72	102.00	0.00	37.00
Longitud del tallo joven	59	80.24	48.64	60.61	14.52	339.00
Número de entrenudos en el tallo joven	59	11.52	3.67	31.83	3.00	21.00
Número de tallos maduros por planta	59	2.54	1.09	42.79	1.00	8.00
Número de entrenudos hasta la primera ramificación	59	1.03	2.85	275.90	0.00	16.00
Número de ramificaciones en el tallo maduro	59	5.78	3.35	58.02	1.00	16.00
Diámetro del tallo maduro	59	5.46	1.42	25.93	2.00	10.00
Longitud de los entrenudos en el tallo maduro	59	15.09	5.14	34.05	2.46	37.00
Número de hojas jóvenes	59	4.27	4.91	115.01	0.00	15.00
Número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas	59	1.71	2.94	171.87	0.00	16.00

Cuadro 8. Análisis de frecuencia para las características cualitativas del tallo joven para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Color del tallo joven	1	Verde	5	0.08
	2	Verde morado	7	0.12
	3	Verde marrón	1	0.02
	4	Marrón oscuro	3	0.05
	5	Morado	4	0.07
	6	Verde amarillo	39	0.66
Ausencia/presencia de alas en el tallo joven	1	Ausente	5	0.08
	2	Presente	54	0.92
Ausencia/presencia de pelos en el tallo joven	1	Ausente	54	0.92
	2	Presente	5	0.08
Ausencia/presencia de espinas en el tallo	1	Ausente	44	0.75
	2	Presente	15	0.25

Las variables cualitativas caracterizadas en el tallo maduro mostraron que el tipo de planta trepadora, el color del tallo maduro verde, la presencia de alas en el tallo maduro y la ausencia de pilosidad del tallo maduro (tallos glabros), presentaron la mayor frecuencia en la población (Cuadro 9). En tallo maduro, el color verde amarillo fue el segundo en importancia contrario a lo que se presenta en el tallo joven.

Cuadro 9. Análisis de frecuencia para las características cualitativas del tallo maduro para las 59 accesiones de ñame (*Dioscorea spp.*)

Características	Clase	Carácter	Frecuencia absoluta	Frecuencia relativa
Tipo de planta	1	Enana	1	0.02
	2	Tipo arbusto	1	0.02
	3	Trepadora	57	0.97
Color del tallo maduro	1	Verde	49	0.83
	2	Verde morado	0	0
	3	Verde marrón	0	0
	4	Marrón oscuro	0	0
	5	Morado	1	0.02
	6	Verde amarillo	9	0.15
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	1	Ausente	5	0.08
	2	Presente	54	0.92
Pilosidad del tallo maduro	1	Ausente	55	0.93
	2	Presente	4	0.07

Las características cualitativas evaluadas en la hoja joven mostraron que el color amarillento con un peciolo verde, se presenta con mayor frecuencia, sin embargo, algunos genotipos presentan una base morada. De igual modo, las accesiones sin pilosidad en la hoja (glabras) también se presentaron en mayor número (Cuadro 10).

Las características cualitativas de la hoja madura más frecuentes fueron: posición de las hojas alternas, tipo de hoja madura simple, lobulado de la hoja madura profundo, sin pilosidad en el haz de la hoja madura y en su peciolo, con un 93% en cada una de ellas. Mientras que en el color de la hoja madura, el carácter verde oscuro se presentó en el 88% de la población, y la forma de la hoja sagitiforame (ancha o larga) es la más frecuente (Cuadro 11). Según Montaldo (1991), las especies *D. alata*, *D. cayenensis* y *D. esculenta* presentan hojas sagitiforames (acorazonada), simples, alternas; mientras que las *D. trifida* son astadas (palmadas).

Cuadro 10. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja joven para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Primer brote de las hojas	1	Temprano	37	0.64
	2	Tardío	21	0.36
Color de la hoja joven	1	Amarillento	46	0.78
	2	Verde claro	11	0.19
	3	Verde oscuro	1	0.02
	4	Verde morado	0	0
	5	Morado	1	0.02
Color del borde de la hoja joven	1	Verde	28	0.47
	2	Morado	31	0.53
Color del peciolo de la hoja joven	1	Todo verde con la base morado	14	0.24
	2	Todo verde con la junta de la hoja morada	0	0
	3	Todo verde morado en ambas puntas	11	0.19
	4	Todo verde morado con base morada	4	0.07
	5	Todo verde morado con junta de la hoja morada	0	0
	6	Todo verde morado, ambas puntas moradas	0	0
	7	Verde	19	0.32
	8	Morado	0	0
	9	Verde marrón	1	0.02
	10	Marrón	0	0
	11	Marrón oscuro	0	0
	12	Otro (Verde amarillento)	10	0.17
Pilosidad del haz/envés de las hojas jóvenes	1	Sin pilosidad	55	0.93
	2	Haz	0	0
	3	Envés	0	0
	4	Ambas	4	0.07

Cuadro 11. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Posición de las hojas maduras	1	Alternas	4	0.07
	2	Opuestas	0	0
	3	Alternadas en la base/opuestas más arriba	55	0.93
Tipo de hoja madura	1	Simple	55	0.93
	2	Compuesta	4	0.07
Lobulado de la hoja madura	1	Lobulado poco profundo	5	0.08
	2	Lobulado profundo	54	0.92
Color de las hojas maduras	1	Amarillenta	1	0.02
	2	Verde clara	0	0
	3	Verde oscura	52	0.88
	4	Verde morada	6	0.1
Pilosidad en el haz hoja madura	1	Sin pilosidad	55	0.93
	2	Escasa	0	0
	3	Densa	4	0.07
Pilosidad del peciolo de la hoja madura	1	Sin pilosidad	55	0.93
	2	Escasa	0	0
	3	Densa	4	0.07
Forma de la hoja madura	1	Cordiforme ancha	2	0.03
	2	Sagitiforme larga	24	0.41
	3	Sagitiforme ancha	28	0.47
	4	Astada	0	0
	5	Otras (Trifoliada)	5	0.08
Ondulación de la hoja madura	1	Sin ondulación	4	0.07
	2	Poca	37	0.63
	3	Mucha	18	0.31
Posición de la parte más ancha de la hoja madura	1	Tercio superior	5	0.08
	2	Medio	53	0.9
	3	Tercio inferior	1	0.02
Pilosidad del peciolo de la hoja madura	1	Sin pilosidad	54	0.92
	2	Escasa	1	0.02
	3	Densa	4	0.07

Cuadro 11. (Cont.). Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Color del peciolo de la hoja madura	1	Todo verde con la base morada	14	0.24
	2	Todo verde con la junta de la hoja morada	0	0
	3	Todo verde morado en ambas puntas	11	0.19
	4	Todo verde morado con base morada	4	0.07
	5	Todo verde morado con junta de la hoja morada	0	0
	6	Todo verde morado, ambas puntas moradas	0	0
	7	Verde	19	0.32
	8	Morado	0	0
	9	Verde marrón	1	0.02
	10	Marrón	0	0
	11	Marrón oscuro	0	0
	12	Otro (Todo verde con base marrón)	10	0.17
Espinosis del peciolo de la hoja madura	1	Escasa	55	0.93
	2	Densa	4	0.07
Ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura	1	Ausente	16	0.27
	2	Presente	43	0.73

En la evaluación de la característica de floración se observó que el 91% de las accesiones no floreció; mientras que un 9% tuvo floración durante los 2 años evaluados (Cuadro 12). Las pocas accesiones que presentaron flores, estas no pasaban de capullo y se adicionaban por este motivo no se registró ningún descriptor de flor.

Cuadro 12. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la floración para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Floración	1	Sin floración	53	0.91
	2	Floración en algunos años	0	0
	3	Floración todos los años	5	0.09

Respecto a la evaluación de los tubérculos aéreos observamos que la frecuencia de accesiones con ausencia de tubérculos aéreos fue mayor; mientras que únicamente un 12% de las accesiones tuvieron ese tipo de tubérculos (Cuadro 13). Esto es una característica particular de la especie *D. bulbifera*. En las accesiones del CATIE hay identificada dos como *D. bulbifera*, por lo que posiblemente algunas *D. sp.* sean *D. bulbifera*. Se ha reportado sin embargo, que algunas especies distintas de la de *D. bulbifera* presentan tubérculos aéreos rudimentarios (Nelly Vásquez com. pers.).

Cuadro 13. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de los tubérculos aéreos para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Ausencia/presencia de tubérculos aéreos	1	Ausente	52	0.88
	2	Presente	7	0.12

Otro resultado importante de destacar es que un 92% de la población en estudio mostró una altura de tallo localizada entre 2-10 m y una longitud del peciolo de la hoja madura entre 6-9 cm con frecuencia de 53% y 46% para el carácter ≥ 10 cm (Cuadro 14).

Cuadro 14. Análisis de frecuencia para las características cualitativas de la altura del tallo maduro y la longitud del peciolo de la hoja madura para las 59 accesiones de ñame (Dioscorea spp.)

<i>Características</i>	<i>Clase</i>	<i>Carácter</i>	<i>Frecuencia absoluta</i>	<i>Frecuencia relativa</i>
Altura del tallo maduro	1	< 2 m	4	0.07
	2	2 - 10 m	54	0.92
	3	> 10 m	1	0.02
Longitud del peciolo de la hoja madura	1	≤ 5 cm	1	0.02
	2	6 - 9 cm	31	0.53
	3	≥ 10 cm	27	0.46

4.1.3 Análisis estadístico inferencial de los datos de la población

4.1.3.1 Agrupación de las accesiones en función de variables cuantitativas

La base de datos de descriptores cuantitativos completos sólo contenía 10 descriptores (días de brote, longitud del tallo joven, número de entrenudos del tallo joven, número de tallos maduros por planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo maduro, longitud de los entrenudos en el tallo maduro, número de hojas jóvenes y número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas). En el análisis estadístico de conglomerado jerárquico de las accesiones de ñame usando las variables cuantitativas completas (método de Ward y distancia Euclídea) identificaron seis grupos. El análisis multivariado de varianza para estos seis grupos mostró diferencia significativa entre ellos ($p < 0.0001$). Utilizando una prueba gDGC multivariada se pudo verificar a posteriori que los seis grupos difieren entre sí ($p < 0.05$, Anexo 6).

Las estadísticas descriptivas (promedio, desviación estándar, coeficiente de variación, valor máximo y mínimo) de los descriptores usados para el agrupamiento de las accesiones se calcularon para cada uno de los seis grupo formados (Cuadro 15). A continuación se describe cada uno de los seis grupos (Figura 4).

Para el **Grupo 1** las características que más contribuyeron a la asociación de las 14 accesiones son: los días hasta el brote con 30 días entre la plantación y el brote; la longitud promedio del tallo joven de 53.07 cm (20 días después del brote, ddb); y el número de tallos maduros por planta de 3 tallos en un promedio de 5 plantas. Las accesiones que constituyen el **Grupo 1** fueron las siguientes: 6319, 12470, 6323, 7088, 7248, 10009, 10715 A, 6322B, 6348 A, 6322 C, 6348 B, 6348 C, 6668 y 9476 (Figura 4).

Las accesiones 6569, 6664, 7363, 10727, 7067, 7064, 7332, 13312, 7060, 7066, 11685 y 7305, que constituyen el **Grupo 2** se caracterizan porque no habían brotado antes de la plantación ni tenían entrenudos hasta la primera ramificación en un promedio de 5 plantas por accesión. A los 20 ddb el número de entrenudos en el tallo joven fue de 15 y a los 30 ddb el número de hojas jóvenes era de 9. (Figura 4).

El **Grupo 3** está conformado por las accesiones 6670, 7299, 7059, 10718, 7291, 7356, 7297, 11425, 11684, 11693 y 12174. El número de ramificaciones en el tallo maduro, con 8 ramas sobre la superficie y el número de entrenudos en la primera ramificación son variables indicadoras en la formación de grupo (Figura 4).

El **Grupo 4** está formado por tres accesiones (6674, 11690 y 11735). Las variables y sus valores como: longitud del tallo joven de 154.44 cm, el diámetro del tallo maduro con 8 cm medidos a los 15 cm de la base de la planta, la longitud de los entrenudos en el tallo maduro de 27.67 cm medidos a una altura de un metro en un promedio de cinco plantas, y el número de tallos maduros por planta con 1.67 de un promedio de 5 plantas; son las características más sobresalientes del grupo (Figura 4).

En el **Grupo 5** que agrupa 16 accesiones, tiene variables definidas para la separación como: número de entrenudos hasta la primera ramificación de 0.44 de un promedio de cinco plantas; longitud de los entrenudos en el tallo maduro de 12.34 cm a la altura de un metro en un promedio de cinco plantas, y el número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas de 0.62 promediado en cinco plantas. Las accesiones presentes en éste grupo fueron: 6322 A, 10715 B, 6324, 10722, 6344, 10733, 6346, 6347, 7079, 7231, 12460, 13175, 7311, 7333, 12451 y 10739 (Figura 4).

El **Grupo 6** cuenta con 3 accesiones (6327 A, 6328 y 6327 B) y las variables que lo distinguen son: el número de entrenudos hasta la primera ramificación y el número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas con 12 ramificaciones y entrenudos respectivamente, el número de ramificaciones en el tallo maduro fue de una rama sobre la superficie; y sin hojas jóvenes a los 30 ddb (Figura 4). Es importante tener en cuenta, que se debe incluir las características para clasificar las especies y así clasificar las accesiones que cuenten con más de una repetición, como por ejemplo: modalidad de trepado de la planta, relación entre los tubérculos subterráneos, tipo de corno, forma del tubérculo y color del tubérculo.

Cuadro 15. Estadísticas descriptivas de los 6 grupos formados usando descriptores cuantitativos completos

Grupo	Resumen	DIBRO	LONTAJO	ENTAJO	NUTAMA	ENTPRIRAM	NURAMTAMA	DIATAMA	LONANTALMA	NUMHOJOV	NUMENTHO
1(n=14)	Media	30.57	53.07	8.86	3.36	0.50	6.93	5.47	15.27	0.29	1.57
	D.E.	9.83	19.96	2.85	1.60	0.85	4.05	1.07	2.46	1.07	1.60
	CV	32.17	37.61	32.20	47.61	170.97	58.41	19.65	16.11	374.17	102.05
	Mín	0.00	17.50	3.00	2.00	0.00	2.00	4.00	11.00	0.00	0.00
	Máx	37.00	94.00	13.00	8.00	3.00	16.00	7.94	21.00	4.00	5.00
2(n=12)	Media	0.00	101.23	15.42	2.75	0.00	4.42	5.39	13.77	9.58	0.67
	D.E.	0.00	45.92	2.71	0.45	0.00	1.38	0.78	1.64	3.00	0.89
	CV	sd	45.36	17.59	16.45	sd	31.22	14.43	11.89	31.29	133.14
	Mín	0.00	14.52	11.00	2.00	0.00	2.00	4.00	10.00	7.00	0.00
	Máx	0.00	205.00	21.00	3.00	0.00	8.00	7.00	16.00	15.00	2.00
3(n=11)	Media	29.18	77.30	12.82	2.09	0.45	8.36	6.20	15.50	7.73	1.45
	D.E.	4.60	8.73	1.60	0.54	0.69	2.98	0.98	2.48	4.52	0.82
	CV	15.76	11.29	12.49	25.80	151.26	35.58	15.81	16.00	58.48	56.39
	Mín	23.00	66.10	11.00	1.00	0.00	4.00	4.00	12.00	0.00	0.00
	Máx	35.00	99.30	16.00	3.00	2.00	14.00	7.00	20.00	13.00	2.00
4(n=3)	Media	20.67	154.44	14.33	1.67	1.67	3.67	8.00	27.67	2.00	2.67
	D.E.	18.58	165.00	2.52	1.15	2.89	1.53	2.00	12.10	3.46	4.62
	CV	89.92	106.84	17.56	69.28	173.21	41.66	25.00	43.72	173.21	173.21
	Mín	0.00	21.20	12.00	1.00	0.00	2.00	6.00	14.00	0.00	0.00
	Máx	36.00	339.00	17.00	3.00	5.00	5.00	10.00	37.00	6.00	8.00
5(n=16)	Media	4.31	76.90	9.88	2.25	0.44	5.19	4.83	12.34	2.63	0.63
	D.E.	9.30	33.74	2.06	0.86	0.63	3.06	1.47	4.69	4.10	0.89
	CV	215.66	43.87	20.88	38.06	143.81	58.98	30.39	37.99	156.07	141.61
	Mín	0.00	19.00	6.00	1.00	0.00	2.00	2.93	2.46	0.00	0.00
	Máx	25.00	146.86	13.00	4.00	2.00	14.00	8.00	19.00	10.00	3.00
6(n=3)	Media	9.67	77.58	9.50	2.00	12.33	1.67	3.86	20.17	0.00	12.33
	D.E.	16.74	45.39	7.47	0.00	3.51	0.58	1.64	4.65	0.00	3.51
	CV	173.21	58.51	78.60	0.00	28.47	34.64	42.37	23.04	sd	28.47
	Mín	0.00	51.25	4.00	2.00	9.00	1.00	2.00	17.00	0.00	9.00
	Máx	29.00	130.00	18.00	2.00	16.00	2.00	5.07	25.50	0.00	16.00

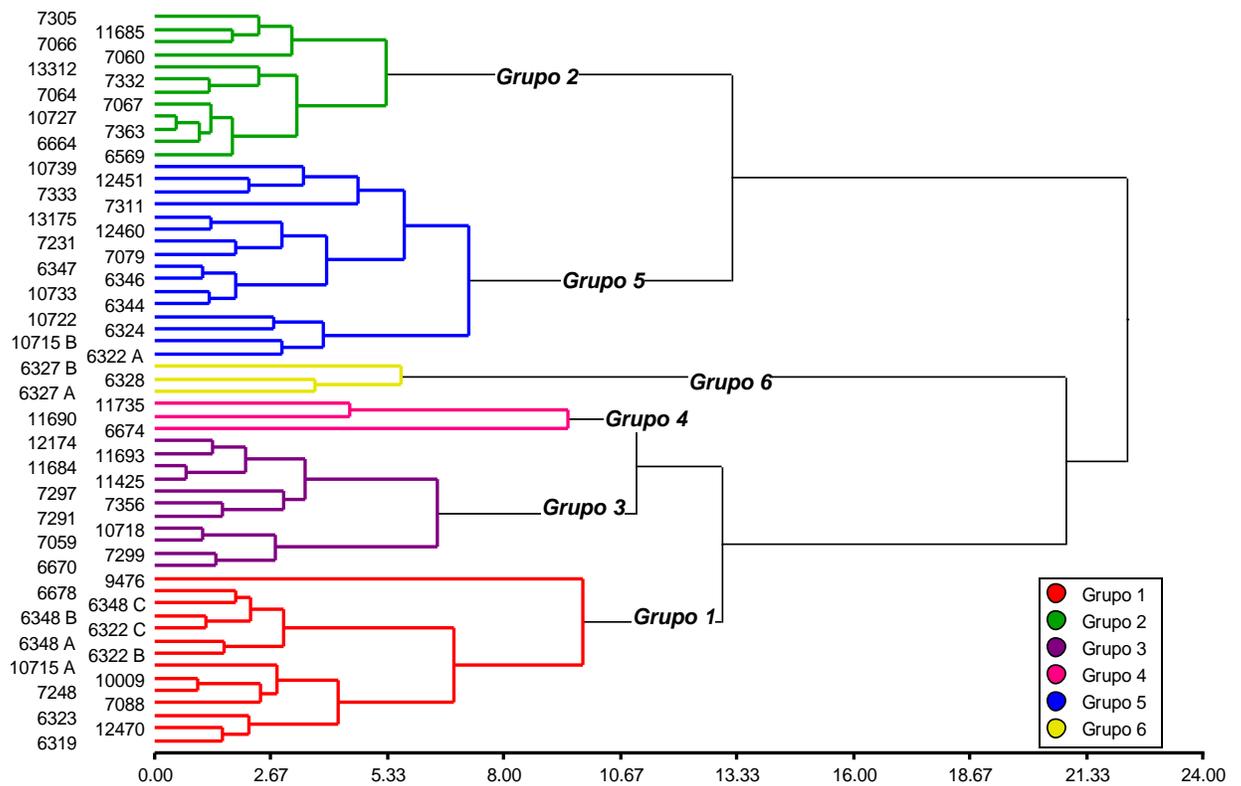


Figura 4. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia Euclídea) de las variables cuantitativas completas caracterizadas en 59 accesiones de ñame (*Dioscorea* spp.).

El análisis de funciones discriminantes para los descriptores cuantitativos muestra que el eje canónico uno, separa claramente el Grupo 6 de los demás grupos, indicando que es el que más difiere con respecto a los demás. En el eje canónico dos, se separan los Grupos 1, 3 y 4 de los Grupos 2 y 5; mientras que los Grupos 1-3, 1-4, y 3-4 se mezclan entre ellos (Figura 5). El Grupo 5 es el más cercano al Grupo 3 por lo que se puede decir que son grupos parecidos. El Grupo 6 está compuesto completamente por accesiones de *D. alata* y es el más diferente del resto. Sin embargo, también hay accesiones de *D. alata* que se presentan en los demás grupos. Recordemos que *D. alata* era la especie con más accesiones dentro de la colección, y que de los 10 descriptores completos representan apenas un 15% de los descriptores cualitativos del IPGRI (1997). La ausencia de algunos descriptores importantes en esta clasificación puede llevar a que *D. alata* aparezca mezclada con el resto de las especies.

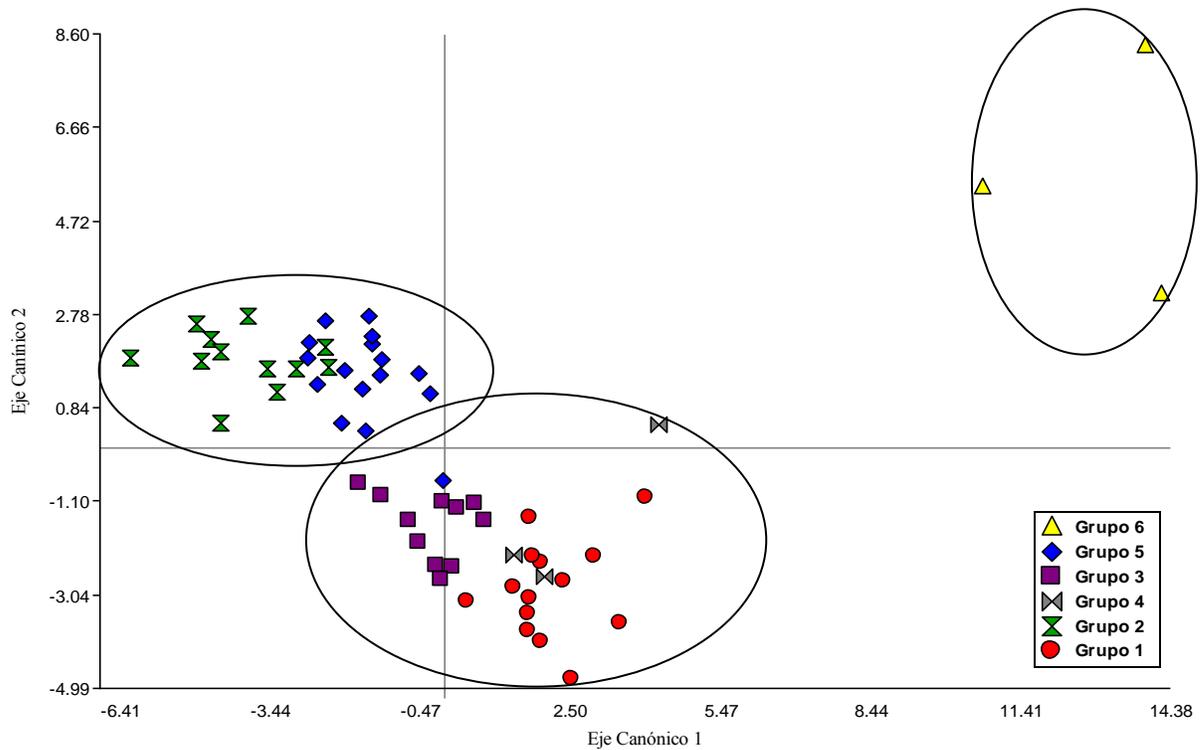


Figura 5. Gráfico de funciones discriminantes entre grupos para las 59 accesiones de ñames (*Dioscorea* spp.) descritas.

El análisis discriminante lineal mostró que las dos primeras funciones discriminantes son suficientes para clasificar los grupos formados, ya que la representación gráfica explica una variabilidad del 86.39%. Para identificar las variables con mayor peso en la discriminación se buscan los autovalores con mayor valor absoluto (esto debido a que los autovalores pueden ser positivos y negativos). Las variables con mayor capacidad discriminante en la primera función fueron días de brote, número de entrenudos en el tallo joven y número de entre nudos hasta la primera ramificación; mientras que en el eje dos fueron días de brote, número de tallos maduros por planta y número de entrenudos hasta la primera ramificación (Cuadro 16).

Cuadro 16. Análisis discriminante para las variables cuantitativas-datos estandarizados con las varianzas comunes

Variables	Eje 1	Eje 2
Días de brote (DB)	0.81	-1.00
Longitud del tallo joven (LTJ)	0.52	0.35
Número de entrenudos en el tallo joven (NETJ)	-0.71	-0.14
Número de tallos maduros por planta (NTMP)	0.39	-0.51
Número de entrenudos hasta la primera ramificación (NEPR)	0.92	0.59
Número de ramificaciones en el tallo maduro (NRTM)	0.03	-0.01
Diámetro del tallo maduro (DTM)	-0.20	-0.32
Longitud de los entrenudos en el tallo maduro (LETM)	0.54	-0.34
Número de hojas jóvenes (NHJ)	-0.37	0.33
Número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas (NEHTA)	0.33	-0.17

Las funciones discriminantes permiten identificar los 6 grupos formados con menos del 5% de error estimado mediante la tasa de error aparente (Cuadro 17).

Cuadro 17. Tabla de clasificación cruzada para los grupos formados

Grupos	1	2	3	4	5	6	Total Error	(%)
1	14	0	0	0	0	0	14	0.00
2	0	11	0	0	1	0	12	8.33
3	0	0	11	0	0	0	11	0.00
4	0	0	0	3	0	0	3	0.00
5	0	0	1	0	15	0	16	6.25
6	0	0	0	0	0	3	3	0.00
Total	14	11	12	3	16	3	59	3.39

Se graficó el ordenamiento obtenido por medio del análisis de coordenadas principales mediante y la técnica de árbol de recorrido mínimo para los descriptores cuantitativos, usando distancia Euclidea para el conjunto de descriptores cuantitativos completos (Figura 6). Las primeras dos coordenadas principales explican un 24.4% y un 20.3% respectivamente. Las accesiones que presentaron mayor similitud fueron: 7363 con 10727. Este resultado coincide con el análisis de conglomerados. El árbol de recorrido mínimo une las accesiones más parecidas primero, generando así una especie de mapa de las relaciones entre ellas. Como se observa en el árbol de recorrido mínimo la mayoría de las accesiones están muy cercanas, lo que confirma nuevamente que la cantidad de descriptores (10 en este caso) no es suficiente para discriminarlas completamente. Las accesiones que más se diferenciaron del resto fueron:

6327A, 6327B, 6328, pertenecientes al Grupo 6, 6674 y 11690 del Grupo 4, la 7060 del Grupo 2 y la 9476 del Grupo 1.

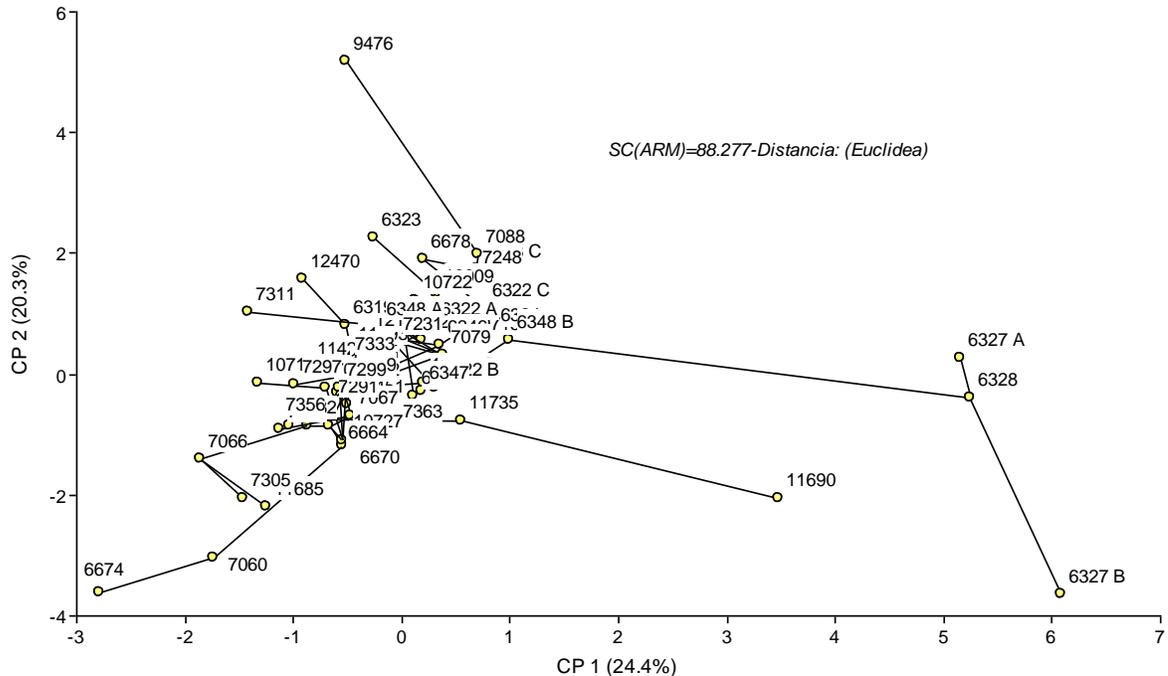


Figura 6. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de coordenadas principales usando distancias de Euclídea para el conjunto de descriptores cuantitativos.

4.1.4 Agrupación de las accesiones en función de variables cualitativas

De las 37 variables cualitativas consideradas sólo 27 formaron parte de la base de datos completas. En el análisis de conglomerado con las variables cualitativas completas usando el método de Ward y una distancia obtenida a partir de los coeficientes de similitud de Jaccard, observamos la formación de 6 grupos en el dendograma (Figura 7).

El **Grupo 3** cuenta con la mayor cantidad de individuos agrupados cualitativamente con la especie *Discorea* spp. procedentes principalmente de Panamá, indicando la posibilidad de que las accesiones pertenezcan a la misma especie. El **Grupo 5** cuenta con cuatro accesiones, dentro del mismo la accesiones 11735 y 11690 son similares y ambas son *D. alata* de CR; mientras que las otras son *D. dumetotum* y *Discorea* spp. En el caso del **Grupo 6** cuenta con cinco accesiones de diferentes especies y procedencia, el **Grupo 2** tiene especies

menos diversas *D. alata* y *D. spp.* con diferentes procedencias. El **Grupo 4** con *D. alata* y *D. spp.* procedentes de Panamá y Puerto Rico, mientras que el **Grupo 1** tiene accesiones diferentes en especies y procedencia con respecto a los demás.

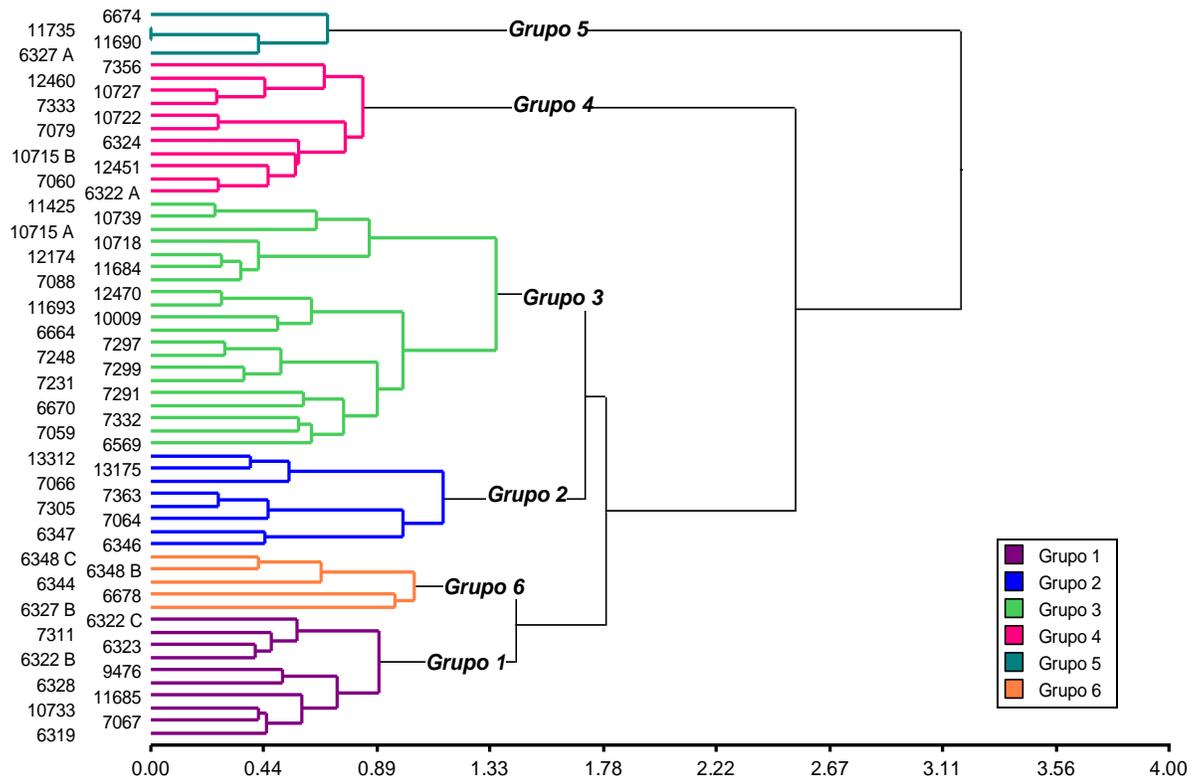


Figura 7. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Jaccard) de las variables cualitativas completas.

Para probar la independencia entre las variables cualitativas y cada uno de los grupos conformados, se confeccionaron tablas de contingencia. Se usó la prueba de Chi cuadrado MV-G2 para probar esta hipótesis con los grupos formados y las categorías de las variables asociadas, usando una significancia de $p \leq 0.05$.

En el análisis cualitativo las variables que no presentaron significancia en la relación de los descriptores con los grupos formados fueron: color del tallo joven, ausencia/presencia de espinas en el tallo joven, tipo de planta, hábito de trepado de la planta, color del tallo maduro, primer brote de las hojas, color de las hojas jóvenes, posición de las hojas maduras, borde de la hoja madura, color de las hojas maduras, forma del ápice de la hoja madura, posición de la parte más ancha de la hoja madura, pilosidad del peciolo de la hoja madura,

ausencia/presencia de tubérculos aéreos, ausencia/presencia de tubérculos subterráneos, y tipo de tubérculos subterráneos.

Las variables significativas de tallo y hoja fueron: ausencia/presencia de pelos en el tallo joven, forma de la hoja madura, ausencia/presencia de alas en el tallo joven, ausencia/presencia de alas en el tallo maduro, pilosidad en el tallo maduro, color del borde de la hoja joven, color del peciolo de la hoja joven, pilosidad del haz/ envés de la hoja joven, tipo de la hoja madura, lobulado de la hoja madura, pilosidad en el haz de la hoja madura, pilosidad en el envés de la hoja madura, ondulación de la hoja madura, color del peciolo de la hoja madura, espinosidad del peciolo de la hoja madura, ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura, y floración.

Podemos observar por ejemplo, que la variable observada en el tallo joven: ausencia/presencia de alas en el tallo joven con su característica presente y ausencia/presencia de pelos en el tallo joven con la característica ausente se relacionan mucho más con el **Grupo 1, 2, 3, 4 y 6**; mientras, que la características ausente y presente de las variables ausencia/presencia de alas en el tallo joven y ausencia/presencia de pelos en el tallo joven se asocian más al **Grupo 5** (Cuadro 18).

Las variables del tallo maduro como ausencia/ presencia de alas con la característica presente y la pilosidad del tallo maduro con la característica sin pilosidad se presenta en los **Grupos 1, 2, 3, 4 y 6**; mientras que las características como ausente y escasa se inclinan más al **Grupo 5** (Cuadro 18).

Cuadro 18. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte del tallo

<i>Variables</i>	<i>Características</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>	<i>Grupo 6</i>	<i>Total</i>
Ausencia/presencia de alas en el tallo joven	Ausente	0	0	0	0	4	1	5
	Presente	10	8	20	11	0	4	53
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Ausencia/presencia de pelos en el tallo joven	Ausente	10	8	19	11	0	5	53
	Presente	0	0	1	0	4	0	5
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	Ausente	0	0	0	0	4	1	5
	Presente	10	8	20	11	0	4	53
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Piloidad del tallo maduro	Sin piloidad	10	8	20	11	0	5	54
	Escasa	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58

Por ejemplo, tenemos que en el **Grupo 5** las 4 accesiones que lo conforman en las variables de tipo de hoja madura son compuestas, y son densas en variables como piloidad del haz de la hoja madura y en la piloidad del envés de la hoja madura. Además, no presenta ondulación de la hoja madura; mientras que en la variable floración, la característica que más sobresale es la de floración todos los años. Este grupo se comporta diferente al resto de las accesiones (Cuadro 19).

Cuadro 19. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de la hoja

<i>Variables</i>	<i>Características</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>	<i>Grupo 6</i>	<i>Total</i>
Color del borde de la hoja joven	Verde	2	7	3	10	4	2	28
	Morado	8	1	17	1	0	3	30
	Total	10	8	20	11	4	5	58
	Todo verde con la base morada	0	0	14	0	0	0	14
	Todo verde, morado en ambas puntas	10	0	0	0	0	0	10
	Todo verde morado con base morada	0	0	1	0	0	3	4
Color del peciolo de la hoja joven	Verde	0	0	3	11	4	1	19
	Verde marrón	0	0	0	0	0	1	1
	Otro	0	8	2	0	0	0	10
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Pilosidad del haz/envés de la hoja joven	Sin pilosidad	10	8	20	11	0	5	54
	Ambas	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Tipo de hoja madura	Simple	10	8	20	11	0	5	54
	Compuesta	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Lobulado de la hoja madura	Lobulado poco profundo	0	0	0	0	4	1	5
	Lobulado profundo	10	8	20	11	0	4	53
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Pilosidad en haz de la hoja madura	Sin pilosidad	10	8	20	11	0	5	54
	Densa	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Pilosidad en el envés de la hoja madura	Sin pilosidad	10	8	20	11	0	5	54
	Densa	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Forma de la hoja madura	Cordiforme ancha	1	0	0	0	0	1	2
	Sagitiforme larga	4	3	6	9	0	1	23
	Sagitiforme ancha	5	5	14	2	0	2	28
	Otro	0	0	0	0	4	1	5
	Total	10	8	20	11	4	5	58

Cuadro 19 (Cont.). Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de la hoja

<i>Variables</i>	<i>Características</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>	<i>Grupo 6</i>	<i>Total</i>
Ondulación de la hoja madura	Sin ondulación	0	0	0	0	4	0	4
	Poca	7	6	9	10	0	4	36
	Mucha	3	2	11	1	0	1	18
	Total	10	8	20	11	4	5	58
	Todo verde con la base morada	0	0	14	0	0	0	14
Color del peciolo de la hoja madura	Todo verde, morado en ambas puntas	10	0	0	0	0	0	10
	Todo verde morado con base morada	0	0	1	0	0	3	4
	Verde	0	0	3	11	4	1	19
	Verde marrón	0	0	0	0	0	1	1
	Otro	0	8	2	0	0	0	10
Total	10	8	20	11	4	5	58	
Espinosidad del peciolo de la hoja madura	Sin espinosidad	10	8	20	11	0	5	54
	Escasa	0	0	0	0	4	0	4
	Total	10	8	20	11	4	5	58
Ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura	Ausente	2	1	1	2	4	5	15
	Presente	8	7	19	9	0	0	43
	Total	10	8	20	11	4	5	58

Podemos observar que en los **Grupos 1, 2, 3, y 4** el comportamiento es muy similar en cuanto a la característica de floración y se caracteriza por no florecer; mientras que los **Grupo 5 y 6** presentaron floraciones todos los años (Cuadro 20).

Cuadro 20. Variables cualitativas completas que mostraron falta de independencia en los grupos por las características evaluadas en la parte de floración

<i>Variables</i>	<i>Características</i>	<i>Grupo 1</i>	<i>Grupo 2</i>	<i>Grupo 3</i>	<i>Grupo 4</i>	<i>Grupo 5</i>	<i>Grupo 6</i>	<i>Total</i>
Floración	Sin floración	10	8	20	11	0	4	53
	Floración todos los años	0	0	0	0	4	1	5
	Total	10	8	20	11	4	5	58

Se realizó un Biplot a partir de un análisis de correspondencia múltiple para mostrar en forma sintética la asociación entre los grupos y las categorías de cada variable cualitativa significativa (Figura 8). Los descriptores floración todos los años y tipo de hoja compuesta se asocian más al **Grupo 5** mientras que los descriptores sin floración se asocian a los **Grupos 2, 3 y 4**. Los descriptores color del peciolo de la hoja joven (CPHJ) y madura (CPHM) se asocian a los **Grupos 2 y 3**, con su categoría todo verde con la base morada. La variable pilosidad del tallo maduro (PTM) con su categoría sin pilosidad es muy particular del **Grupo 4**; así como, la variable color del peciolo de la hoja joven (CPHJ) y madura (CPHM), con su categoría verde. En el **Grupo 1** la categoría todo verde, morado en ambas puntas es muy específico; mientras que para el **Grupo 6**, la categoría todo verde con la base morada y verde marrón se presentan para las variables color del peciolo de la hoja joven (CPHJ) y madura (CPHM).

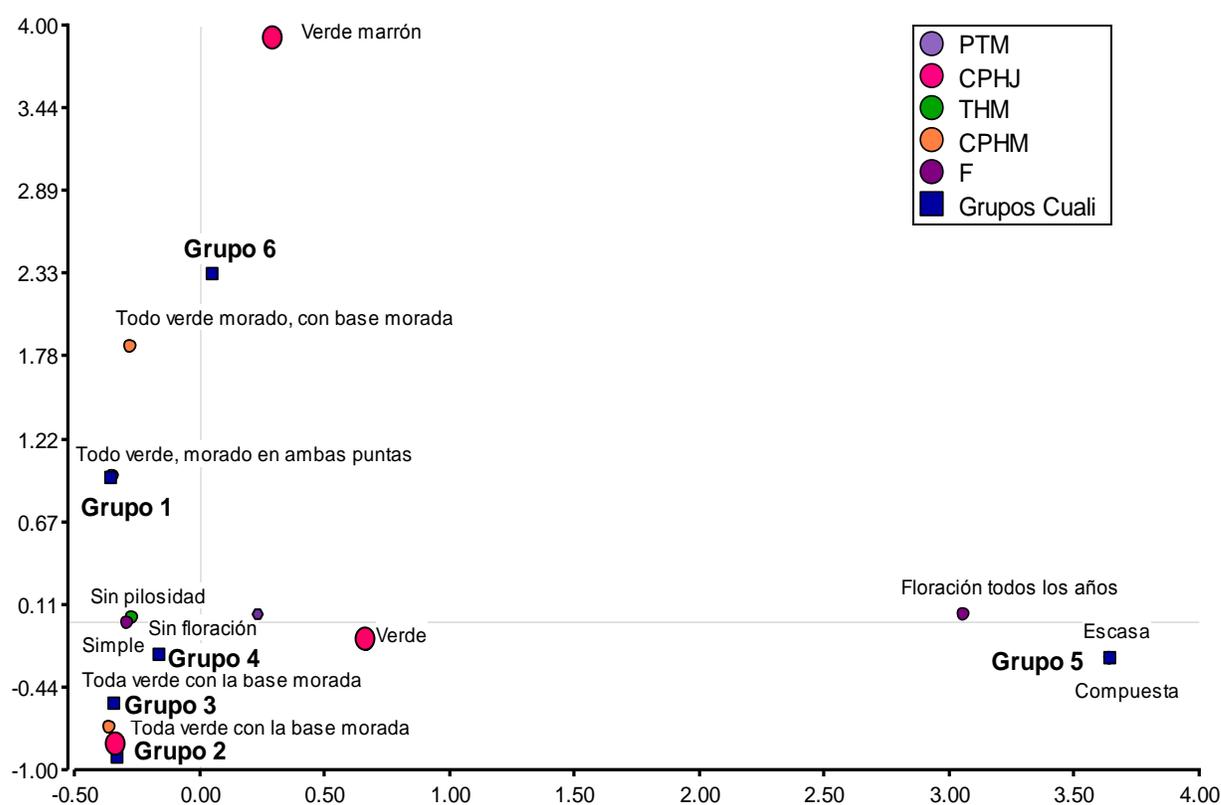


Figura 8. Gráfico Biplot obtenido del análisis de correspondencia de las variables cualitativas más discriminantes (PTM, CPHJ, THM, CPHM y F).

Los ordenamientos obtenidos por medio del análisis de coordenadas principales usando el índice de similitud de Jaccard y la técnica de árbol de recorrido mínimo para los descriptores cualitativos mostraron que las accesiones con mayor similitud fueron las accesiones 10718 y 12174, y las más disimiles fueron 6674 con la 6670. Los componentes principales solo explican el 14.9% en la variabilidad del CP1 y un 12.1% en CP2, donde representan un porcentaje de variabilidad de 27.0% (Figura 9). Si bien estos valores parecieran ser bajos, las representaciones con datos binarios como los usados con la similitud de Jaccard nunca muestran porcentajes de explicación elevados. Comparando este ordenamiento con el obtenido mediante variables cuantitativas completas se puede observar que las accesiones 6327A y 6327B siguen mostrando mayor diferencia con el resto al igual que la 6674.

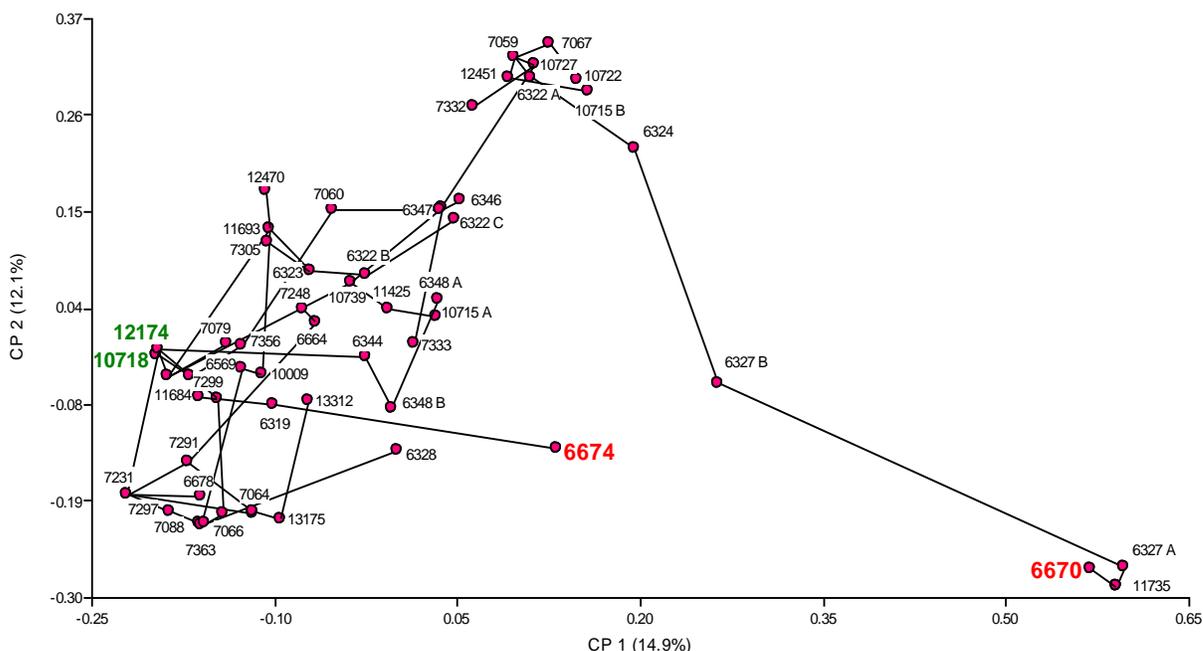


Figura 9. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de coordenadas principales usando el índice de similitud de Jaccard y el conjunto de descriptores cualitativos.

4.1.5 Agrupación de las accesiones en función de variables cualitativas y cuantitativas

El Dendrograma obtenido con el análisis de conglomerado jerárquico de las variables cualitativas y cuantitativas, usando el método de Ward y la distancia obtenida, a partir del coeficiente de similitud de Gower nos muestra la formación de seis grupos (Figura 10).

El **Grupo 4** contiene el mayor número de accesiones (19 individuos); mientras que el **Grupo 6** muestra cuatro accesiones. Los grupos con más similitud por las variables cualitativas y cuantitativas son el **Grupo 1** con el **Grupo 2**; y los de menor similitud, el **Grupo 1** con respecto al **Grupo 6**. Los grupos **1, 3, y 5** se constituyen por 10 accesiones cada uno.

El **Grupo 1** está constituido por las accesiones 6319, 7067, 10733, 6328, 9476, 6322 B, 6322C, 6323, 7311 y 11685; y en el **Grupo 2**, la 6344, 6569, 6348B, 6348C y 6678. Agrupadas en el **Grupo 3** tenemos la 6346, 6347, 6664, 7332, 7064, 7305, 7363, 7066, 13175 y 13312; mientras que el **Grupo 4** lo conforman las accesiones: 6670, 7291, 7356, 7059, 7231, 7248, 7297, 7299, 7088, 10718, 11684, 12,174, 10009, 11693, 12470, 10715A, 10739, 11425 y 12460. El **Grupo 5** son la 6322A, 6324, 10175B, 7060, 10727, 7333, 12451, 7079 y 10722 y 6327, agrupadas en el **Grupo 6** tenemos las accesiones 6327A, 11690, 11735 y 6674.

En el **Grupo 3** y el **Grupo 4**, algunas accesiones pertenecen a la lista que presenta Rivas-Platero y Chavarría (1997), por lo que podríamos decir que entre ellas hay moderada resistencia y susceptibles. El **Grupo 2** lo conforma una única accesión y en el **Grupo 6** la accesión 6674, y las accesiones mas similares son 116693 y 12174. del **Grupo 4**. Se puede señalar que algunos grupos son muy similares a los agrupamientos formados en el dendrograma de variables cualitativas completas, Los Grupos como el **Grupo 1** es muy similar en algunas accesiones de la cualitativa, el **Grupo 4** con el **Grupo 3**, **Grupo 3** con **Grupo 2**, **Grupo 5** con **Grupo 4** y **Grupo 6** con algunos del **Grupo 5** del dendrograma con las cualitativas.

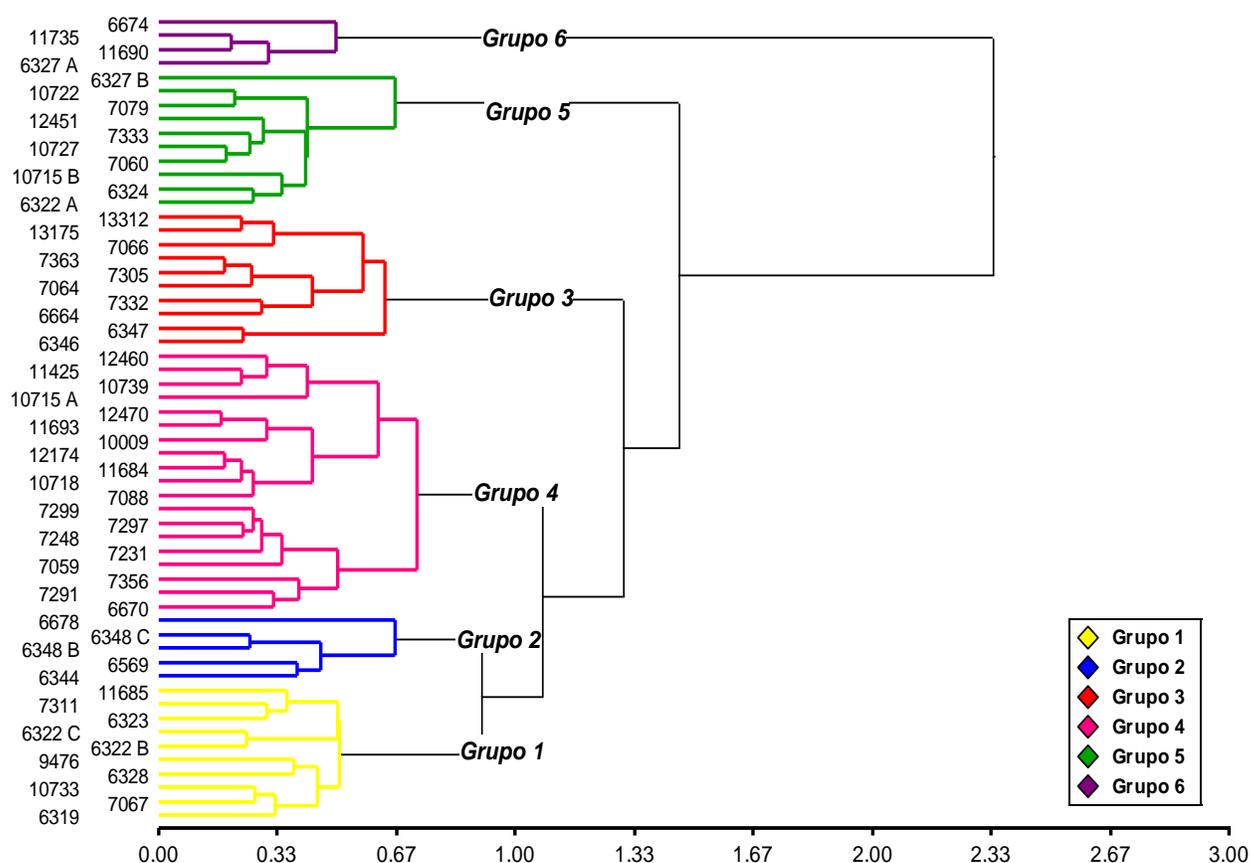


Figura 10. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Gower) de las variables cualitativas y cuantitativas completas.

El árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de Coordenadas Principales usando la distancia construida a partir del índice de similaridad de Gower para los descriptores cuantitativos y cualitativos completos; mostraron que las accesiones más diferentes fueron las accesiones pertenecientes al grupo de *D. alata* como se explican en los arboles de recorrido mínimo obtenidos por las variables cuantitativas y cualitativas por separado.

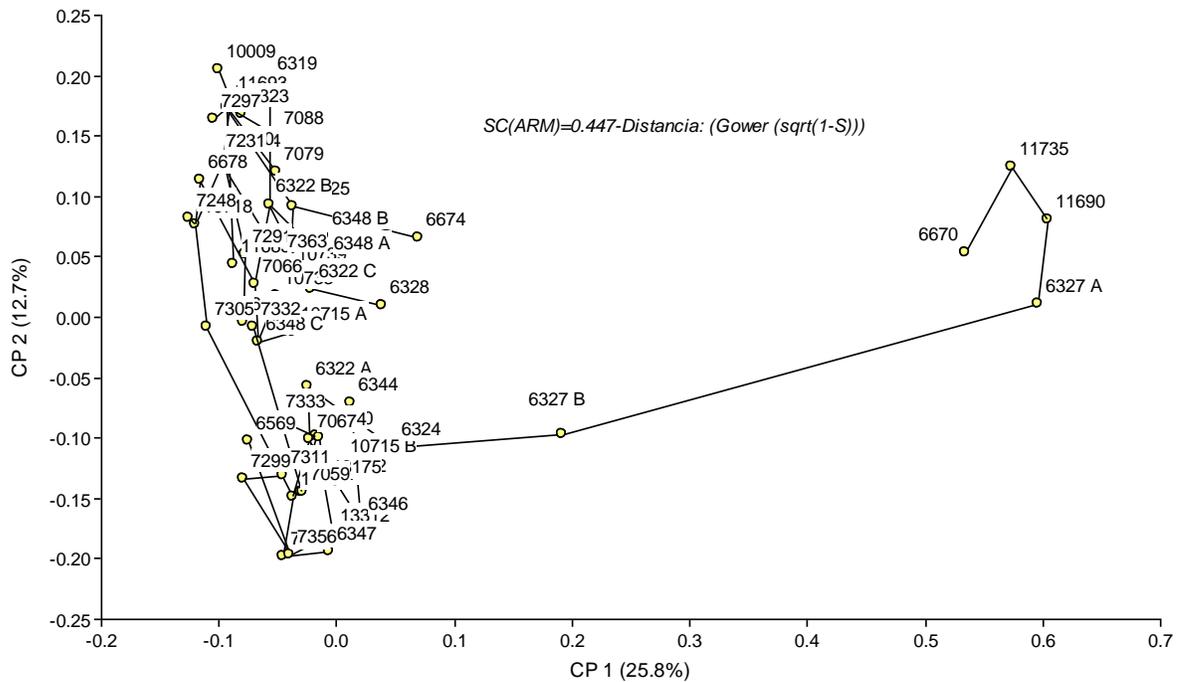


Figura 11. Árbol de recorrido mínimo obtenido mediante análisis de Coordenadas Principales usando distancia construida a partir del índice de similaridad de Gower para los descriptores cuantitativos y cualitativos completos.

De los 155 descriptores morfológicos que se establecen para la caracterización de la planta de ñame (IPGRI 1997), se utilizaron únicamente 60 descriptores en la evaluación de las 59 accesiones de *Dioscorea* spp. que corresponden a las características de desarrollo vegetativo de tallo, hojas, floración, fruto, tubérculos aéreos y subterráneos. Las 60 características seleccionadas para la evaluación se dividieron en 23 características cuantitativas y 37 cualitativas codificadas. De las 23 variables cuantitativas sólo 10 tienen datos completos, y sobresalen en las en las secciones de tallo y hoja, en su estado joven y maduro. González (2003) coincide en que las variables más discriminantes están en la sección del tallo. Las 37 variables cualitativas, sólo 33 son las que más discriminantes según el análisis discriminante. La caracterización morfológica reveló que las accesiones tienden a ubicar la mayor frecuencia en el color amarillento en la hoja con un peciolo verde o morado y en algunos casos con hojas glabras en hojas jóvenes, mientras que en hojas maduras el color verde oscuro con peciolos verdes, verdes con base morada y verdes con base marrón. En las accesiones evaluadas la mayoría presentaron hojas alternadas en la base y opuestas más arriba,

con tipo de hoja simple, no mostraron pilosidad del peciolo ni en el haz; mientras que a su vez no presentaban floraciones anuales, tubérculos aéreos.

4.2 Caracterización molecular

4.2.1 Comportamiento biológico de la población para la caracterización molecular

Las extracciones de ADN, llevadas a cabo tres veces consecutivas, presentaron muchos problemas. La primera extracción realizada a inicios del 2010 con material vegetal tierno, presentó inconvenientes debido a que el equipo o los reactivos utilizados no fueron de buena calidad. Se realizó una segunda extracción, utilizando material vegetal en etapa adulta (hojas muy maduras), que tampoco dio buenos resultados. Fue así como, una tercera extracción utilizando material tierno para la mayoría de las accesiones y material proveniente de cultivo *in vitro* para otras (6348 A, 10733, 11690 y 11735), permitió la obtención de mejor cantidad y calidad de ADN. Esto a su vez hizo posible desarrollar el protocolo de amplificación (restricción, ligación, preamplificación y amplificación de ADN por las combinaciones enzima/primer). Además, permitió determinar, la dilución óptima de la preamplificación para realizar la amplificación de cada combinación de enzimas-primer.

4.2.1.1 Aislamiento y concentración de ADN

Para este trabajo se propuso un protocolo estandarizado desarrollado en colaboración con Ph. D. Albertazzi y M.Sc. Villalobos que permitió la obtención de un ADN con mejor calidad, libre de polisacáridos y otros contaminantes del ADN en las extracciones (Albertazzi y Villalobos com. pers.). Las extracciones iniciales de ADN, utilizando el método CTAB-2X de Doyle y Doyle (1987), modificado por Villalobos (2011) con Cloruro de Sodio 5M, fueron muy exitosas. Dicha modificación fue necesaria debido al alto contenido de polisacáridos en las muestras (sustancia mucilaginosa) que impedían su manipulación. Los polisacáridos son el contaminante que más precipita junto al ADN que se extrae del material.

El ADN necesario se extrajo de una mitad de la hoja pequeña de ñame (entre 2 a 4 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho; idealmente sin vena media gruesa). La calidad del ADN revelada en geles de agarosa 0.8% con Bromuro de Etidio, en algunos casos mostraron bandas

claras y definidas, en otras muy débiles, unas con barridos por causa de la acumulación de polisacáridos o por las altas concentraciones del ADN. También se refleja en las lecturas del espectrofotómetro que las cantidades varían, donde algunas muestras presentaban cantidades por debajo de 120 ng, mientras que otras estaban entre los 245 ng, 300 ng, 448 ng, 510 ng y una en 725 ng. El ADN promedio era de 386 ng.

Según Weising et ál. (1995), citado por González (2003) el ADN migra dentro del gel, permitiendo determinar su concentración a través del grosor e intensidad de la banda obtenida de cada muestra, comparándola con el patrón de bandas producidas por el marcador, las cuales se revelan por medio de la tinción con bromuro de etidio y son observadas a través de luz ultravioleta. En el estudio de Malapa et ál. (2003) la concentración fue de 50 ng/ml de ADN para la amplificación de los primer AFLP.

4.2.1.2 Procedimiento de la técnica de AFLP (Invitrogen)

La caracterización molecular se inició con la técnica molecular de AFLP utilizando el ADN de las accesiones, los kit y demás reactivos para el desarrollo del mismo en concentraciones indicadas. El inicio de la implementación de la técnica consistió en realizar cada proceso; restricción o digestión, ligación, preamplificación diluida de digestión/ligación y por último la amplificación con las combinaciones de las enzimas

4.2.1.3 Descripción del polimorfismo revelado

De las 11 combinaciones de enzimas/primer analizadas, sólo 6 produjeron polimorfismos reproducibles por lo que se eligieron para realizar el análisis de los ADN de las accesiones en estudio. En el Cuadro 21 se presentan las combinaciones “enzima-primer” utilizadas en la amplificación, dando como resultados, un promedio de 67.5 bandas amplificadas por muestra. De las 366 bandas polimórficas totales, el promedio por combinaciones fue de 61.

La combinación de “enzima-primer” E-AGC/M-CAC, amplificadas en un rango de 100-400 pares de bases produjo el mayor número de bandas polimórficas con 15 bandas únicas, y el menor número de bandas se observó en la combinación E-AAC/M-CAG, en un rango de 200-600 pares de base, con 4 bandas únicas. En el estudio de

Malapa et ál. (2003) los tamaños de los fragmentos de AFLP variaron de 50 a 350 pb; mientras que en este estudio el rango de los tamaños oscila entre 100 y 900 pb.

En estudios realizado por Malapa et ál. (2003), también realizo caracterizaciones con marcadores moleculares en especies de *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. cayenensis*, *D. esculenta*, *D. pentaphylla* y *D. trifida*. Realizó cuatro estudios. En el primer estudio evaluó 14 materiales de *Dioscoreas*, en el segundo 28, en el tercero 83 y en el cuarto 23 materiales, procedentes de Benin, Guadeloupe, New Caledonia, Vietnam y Vanuatu; mientras que en nuestro estudio se evaluaron 46 accesiones de las 59 accesiones de diferentes especies y procedencia.

De las combinaciones utilizadas por Malapa et ál. (2003) en este estudio se utilizaron tres combinaciones “enzima/primer” (E-AAC/M-CAG, E-ACC/ M-CAT y E-ACA/M-CAT). Le produjeron en la primera combinación 93 bandas en dos estudios, la segunda 138 bandas en tres estudios y la última combinación le dio 98 bandas polimórficas por par de primers. En nuestro estudio la primera combinación produjo 51 bandas, el segundo 50 bandas y la tercera combinación 64 bandas polimórficas en la caracterización molecular de las 46 accesiones. Malapa et ál. (2003), evaluó en sus estudios al menos unas 116 accesiones procedentes de Benin, Guadeloupe, New Caledonia, Vietnam y Vanuatu.

Cuadro 20. Combinaciones “enzima/primers” utilizadas, promedio de bandas amplificadas, número de bandas polimórficas, porcentaje de polimorfismo, bandas únicas y rango de amplificación

<i>Combinaciones enzimas-primer</i>	<i>Bandas amplificadas por muestra</i>	<i>Número de bandas polimórficas</i>	<i>Porcentaje de polimorfismo</i>	<i>Bandas únicas</i>	<i>Rango de amplificación en pares de bases</i>
E- AGC / M-CAC	97	95	97.93	15	100-400
E- AGC / M- CAA	63	58	92.06	17	250-900
E- AAC / M- CAG	61	51	83.60	9	200-600
E- ACA / M- CAG	56	48	85.71	4	150-500
E- ACC / M- CAT	56	50	89.28	6	150-400
E- ACA / M- CAT	72	64	88.88	9	150-400
Total		366			
Promedio		61	89.57		

El porcentaje de polimorfismo observado, osciló entre 83.60% para la combinación E-AAC/M-CAG y 97.93% para la combinación E-AGC/M-CAC. El porcentaje promedio de

polimorfismo es las combinaciones “enzima-primer” es de 89.57%. El rango total de amplificación de las bandas obtenidas fue entre 100 y 900 pares de bases.

Con los datos de marcadores moleculares se realizó un análisis de coordenadas principales calculados con el índice de Nei, que mostró el agrupamiento de las accesiones provenientes de siete sitios (Figura 12). En el eje de la Coordenada 1 observamos la formación de dos grupos que difieren y son constituidos por los países de Honduras con las accesiones 6569 y 12174, Estados Unidos y Guatemala con las accesiones 7088 y 11425. En el eje de Coordenada 2 no se aprecian los agrupamientos por países. Este análisis permite ver que las accesiones en el banco de germoplasma de ñame de CATIE son genéticamente diferentes aun dentro de las que provienen de un mismo país o región.

Los valores promedios en las estimaciones de los índices de diversidad de Nei (1973) y Shannon fueron de 0.156 y 0.232, siendo los sitios Desconocido, Puerto Rico y Panamá los más diversos . El menos diverso es Mesoamérica y Caribe (Cuadro 22).

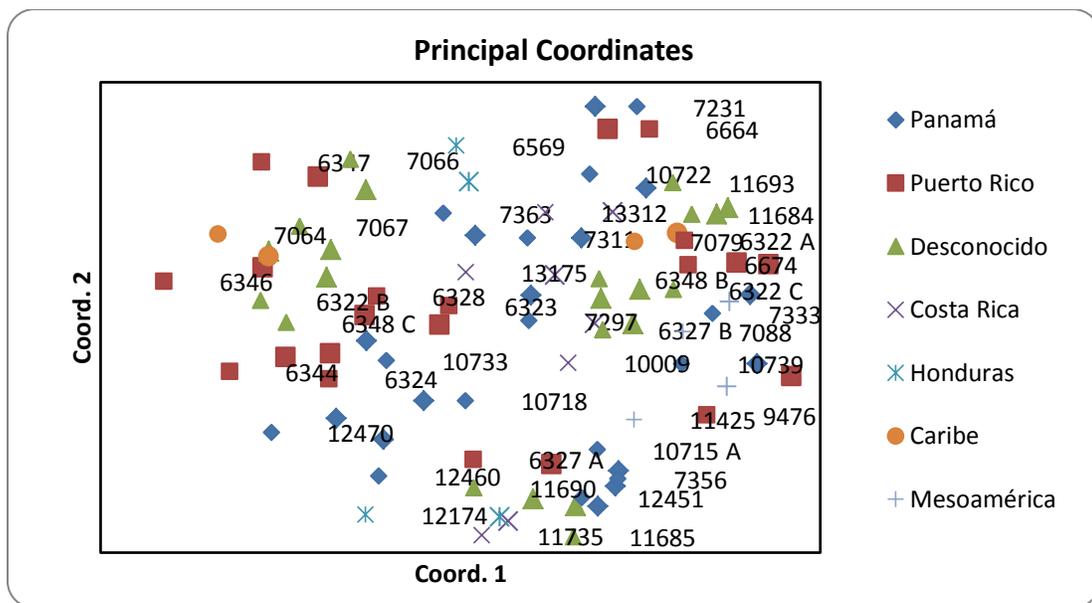


Figura 12. Análisis de Coordenadas principales de AFLP en *Dioscorea* spp.

Los patrones de bandas entre las poblaciones demuestran que la mayor heterosis se dio en la población de Puerto Rico (0.216), Desconocido (0.209) seguido de Panamá con 0.199; mientras que Mesoamérica presenta la menor con 0.098. Los países con menor número de

bandas únicas fueron Honduras y el Caribe, los de mayor cantidad de bandas únicas fueron: Puerto Rico y Desconocido con 19 bandas (Figura 13).

4.3 Comparación de la variabilidad detectada a partir de características morfológicas y marcadores moleculares

Solo 46 accesiones pudieron ser analizadas por medio de marcadores moleculares porque contaban con la suficiente cantidad de ADN requerido para esta técnica con AFLP. Para esta selección, también se tomo en cuenta que las cantidades de bandas polimórficas fueran mayores de 30 en cada accesión. La comparación de la variabilidad detectada por características morfológicas y marcadores moleculares en las 46 accesiones de ñame evaluadas en la etapa de laboratorio (Anexo 9), se realizó primeramente a través de dendrogramas obtenidos por análisis de conglomerados con el método de Ward; y las distancias calculadas con Rogers y Tanimoto para datos moleculares.

Cuadro 21. Proporción de loci polimórficos, índice de Nei (1973) y el índice de Shannon para 366 loci- polimórficos en 46 individuos de Dioscorea sp.

<i>Población</i>	<i>Índice de diversidad de Nei</i>	<i>Índice de diversidad de Shannon</i>	<i>Número de loci polimórfico</i>	<i>Porcentaje de loci polimórfico</i>
Desconocido	0.209	0.323	19	68.58%
Puerto Rico	0.216	0.333	19	69.43%
Panamá	0.199	0.308	17	65.85%
Costa Rica	0.138	0.201	7	33.61%
Honduras	0.115	0.159	1	22.95%
Meso	0.098	0.136	5	19.67%
Caribe	0.122	0.169	2	24.32%
Promedio	0.156	0.232	10	43.49%

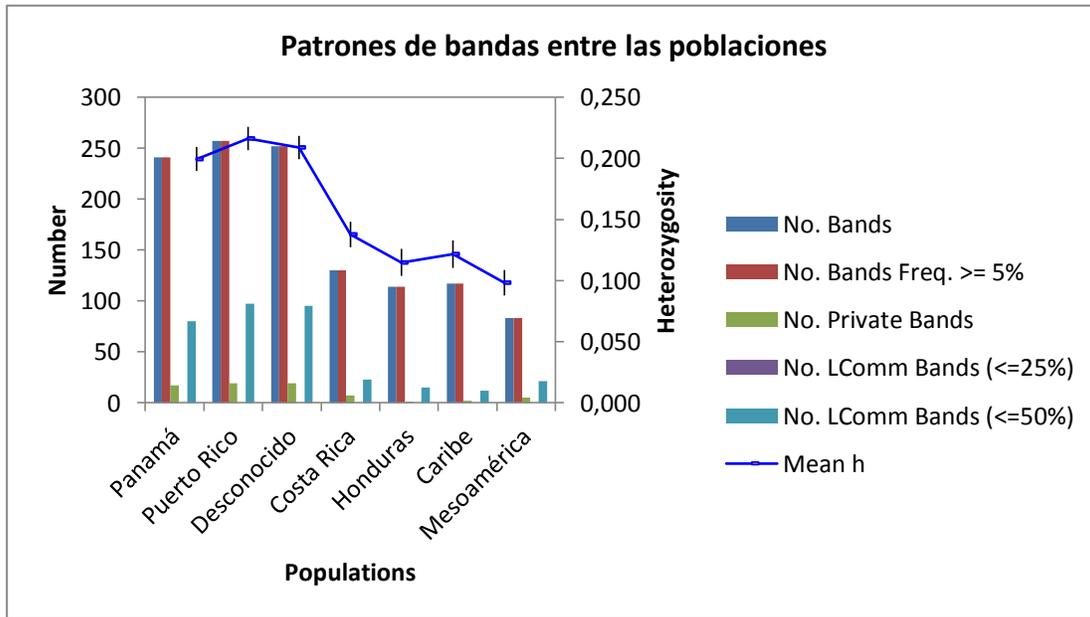


Figura 13. Patrones totales de bandas binarias (haploides) entre poblaciones.

El Dendrograma elaborado a partir del análisis de conglomerados con el Método de Ward y calculado con la distancia de Rogers y Tanimoto, aplicada a datos binarios muestra la formación de seis grupos. Las dos primeras agrupaciones obtenidas de la caracterización genotípica presentan la formación clara, de por lo menos dos grupos de *D. alata* (Grupo 4 y Grupo 5); y un grupo formado por accesiones *D. alata* y *D. spp.*, que pudieran ser clasificadas como *D. alata* por sus lugar de procedencia y por ser accesiones con sufijos debido a algunas características variables entre ellas (Grupo 3). El Grupo 6 conformado por accesiones de *D. spp.* con solo una de *D. trifida* procedentes de Panamá, pudieran ser un grupo solo de *D. trifida*; mientras que el Grupo 1 es el más variables ya que comprende especies como: *D. alata*, *D. trifida*, *D. spp.*, *D. cayenensis*, *D. dumetorum*, *D. bulbifera*, *D. pentaphylla*, y *D. esculenta*. El Grupo 2 conformado por especies de *D. alata*, *D. spp.* y *D. trifida* es también variable y muestra accesiones de diferentes procedencias (Figura 14).

El Grupo 5 es de procedencia desconocida, mientras que el Grupo 1 lo conforman, *D. bulbifera*, *D. dumetotum*, *D. esculenta*, *D. pentaphylla*, *D. trífida* y *D. spp.* con procedencias de CR, Desc, E.U.A, Guadalupe, Guatemala, Panamá y PR. Debido al bajo número de combinaciones utilizadas, los marcadores moleculares no fueron capaces de diferenciar entre especies. Malapa et ál. (2003) utilizó 11 combinaciones de enzimas/primer para evaluar el

polimorfismo de 17 accesiones pertenecientes a ocho especies diferentes, entre ellas *D. alata* y *D. cayenensis*. En este trabajo se utilizaron tres de esas combinaciones que presentaron mayor polimorfismo junto a otras obtenidas en un screening previo, con muestras de ADN de diferentes especies evaluadas en este estudio.

Los Grupos 1, 2 y 3 los conforman algunas de las accesiones que Rivas-Platero y Chavarría (1997) denominaron moderadamente resistentes al YMV y moderadamente resistentes al *Colletotrichum* spp. Las accesiones 11684 y 11693 susceptibles al YMV están en el Grupo 1; y en los Grupos 1 y 4 las accesiones susceptibles al complejo de hongos

Las accesiones 7066 y 7064 son las que tienen mayor similitud entre ellas genéticamente, seguidos de las accesiones 12460 con 12470 y 11684 con 11693. Las accesiones genéticamente menos similares son la 6347 con la 10009; mientras que la accesión del Grupo 5 (6327A) es la más cercana a las 21 accesiones del Grupo 1.

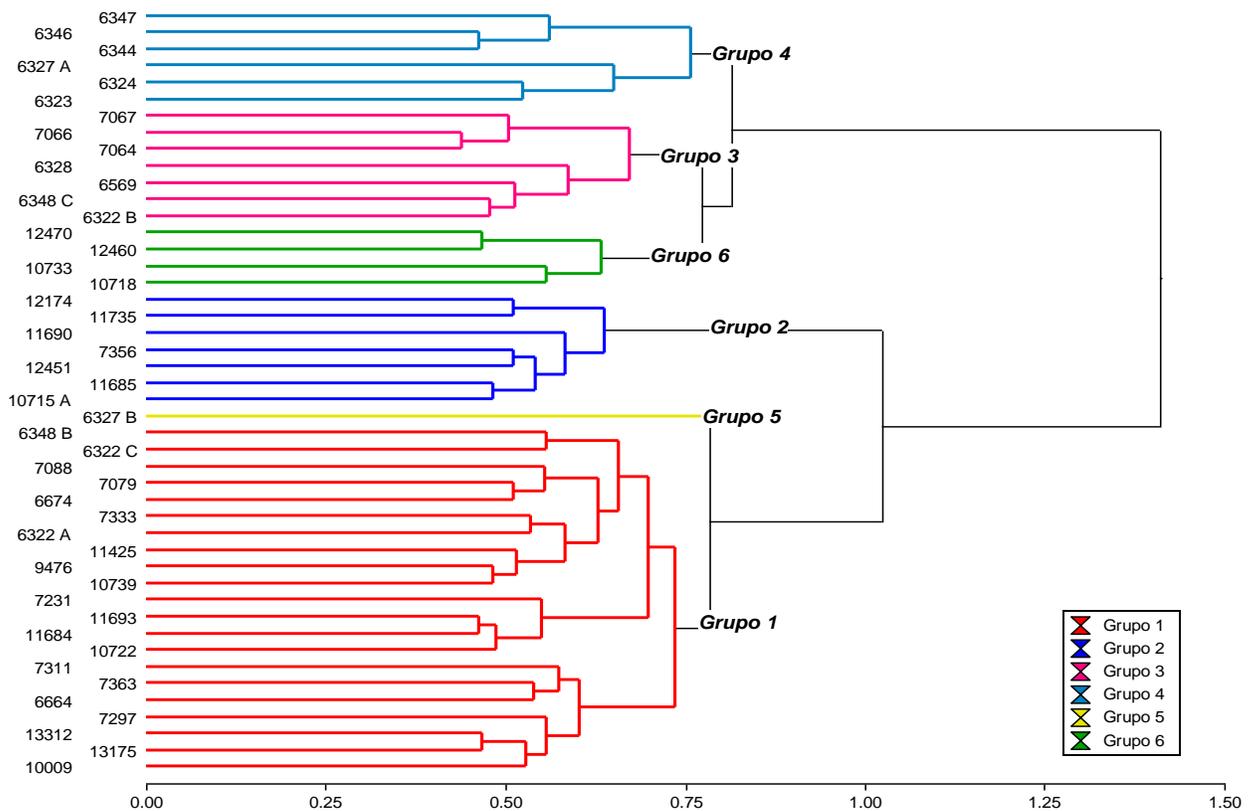


Figura 14. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward y la distancia calculada con Rogers y Tanimoto) para datos moleculares.

La combinación de los datos morfológicos cualitativos y cuantitativos y los datos moleculares de las 46 accesiones utilizadas en la etapa de laboratorio con el Método de Ward (1963) y la distancia calculada partiendo de la similitud de Gower, presenta la formación de seis conglomerados o grupos bien definidos. En la Figura 17, los grupo con mayor similitud son Grupo 1 y Grupo 6; mientras que la menor similitud se observa entre el Grupo 1 con el Grupo 2.

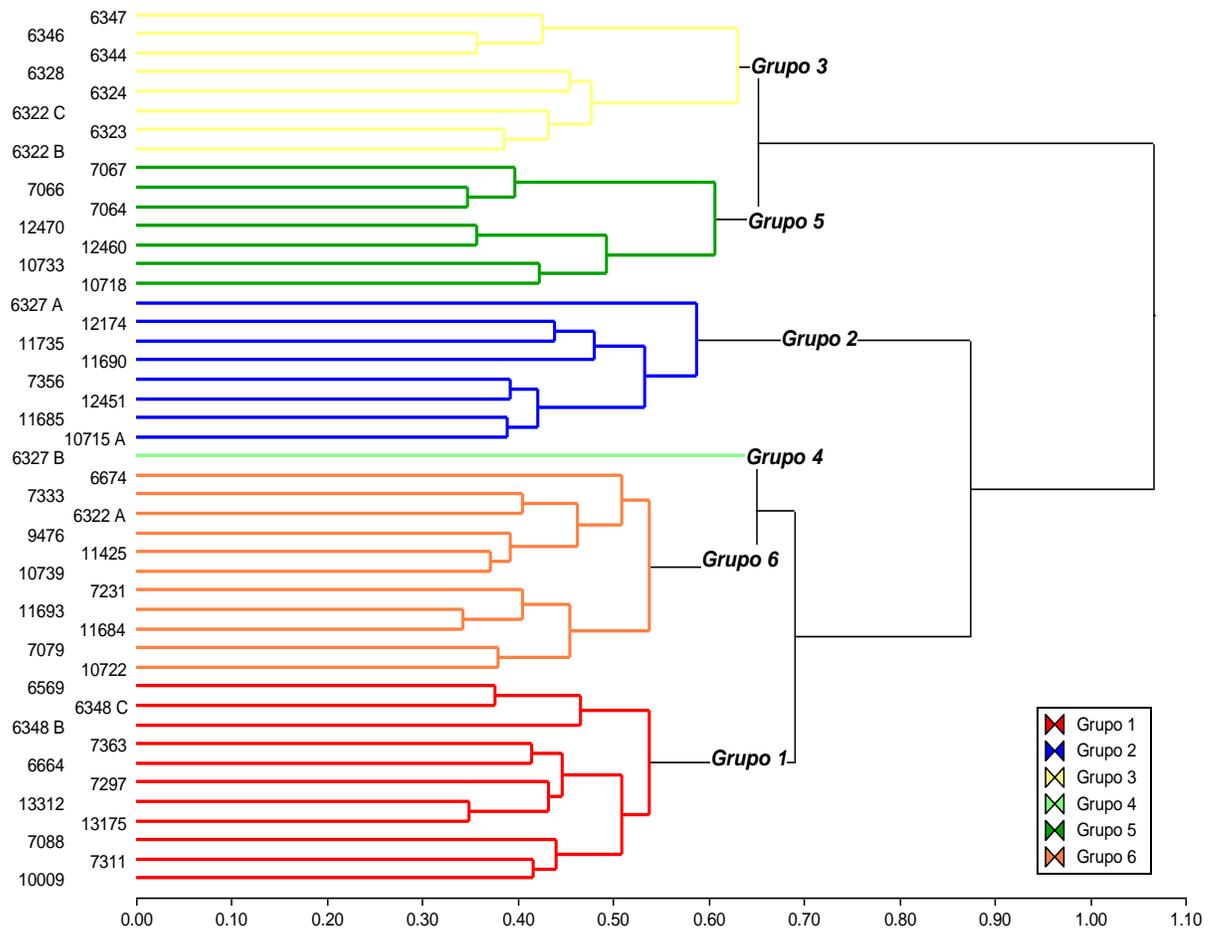


Figura 15. Dendrograma obtenido por análisis de conglomerados (método de Ward, distancia calculada a partir de la similitud de Gower) de las variables cualitativas y cuantitativas completas con la información molecular.

El consenso entre lo morfológico y molecular fue de 0.854. Esto indica que la congruencia de 85% es buena entre la mayoría de las accesiones estudiadas. Las accesiones 6327A, 11690, 11735 y 6674 no muestran una buena congruencia con respecto al resto de los individuos analizados.

Según Demey et ál. (2004) citado por Basil (2007), para relacionar información molecular, morfológica y bioquímica en una colección de yuca (*Manihot esculenta* Crantz). Dichos autores reportan un consenso de 66.5% y concluyen que hay correlación significativa entre la información molecular y morfológica.

Teniendo en cuenta que seguramente la clasificación molecular es la más realista al no estar afectada por las variaciones ambientales, y comparando el dendrograma molecular con el agrupamiento conjunto de molecular y morfológico podemos sintetizar: la 6327B en ambos casos formó un solo grupo, el grupo 4 de agrupamiento molecular es similar al 3 del conjunto. El grupo con más accesiones en lo molecular es el Grupo 1 que contiene las accesiones del Grupo 6 y Grupo 1 en el mixto.

El análisis de conglomerados con el método de Ward y la distancia calculada con la similitud de Gower para las variables cualitativas y cuantitativas completas con los datos moleculares forma un dendrograma con 6 agrupamientos. El Grupo 1 agrupa accesiones de CR, E.U.A, Honduras, Panamá y PR, con especies *D. alata*, *D. bulbifera*, *D. esculenta*, y *D. spp.* Dentro del grupo hay tres accesiones susceptibles al complejo de hongos 7311, 7363 y 10009, la accesión 7363 en estudio de Rivas-Platero y Chavarría (1997) resulto ser moderadamente resistentes al YMV y a *Colletotrichum spp.*, en el presente estudio, posiblemente a variaciones de las condiciones ambientales se ha observado una susceptibilidad a la enfermedad.

El Grupo 4 formada por una sola accesión (6327B) de procedencia desconocida y especie *D. spp.*, es muy similar a las accesiones del Grupo 6. En el Grupo 6 conformado por diferentes especies y procedencias se destacan la presencia de dos accesiones susceptibles al complejo de hongos (7333 y 10722), tres accesiones moderadamente resistentes a *Colletotrichum spp* (7231, 11684 y 11693). Dentro de estas accesiones, la 7231 es moderadamente resistente al YMV, mientras que la 11684 y 11693 pertenecen al grupo de susceptibles al YMV.

El Grupo 2 y Grupo 5 están conformados por accesiones de especies *D. alata*, *D. trifida* y *D. spp.*, procedentes en su mayoría de Panamá, con accesiones moderadamente resistentes a *Colletotrichum spp* y a YMV. La accesión 6327A del Grupo 2 es susceptible al

ataque del complejo de hongos. En el Grupo 3, con la combinación del estudio morfológico y molecular, se agrupan las especies *D. alata* con procedencia de PR, se aprecia además que dos accesiones (6346 y 6324) son susceptibles a *Colletotrichum dioscoreae*., *Cercospora* sp., *Didymosphaeria donacina*, *Phyllosticta dioscoreae* y *Ramularia dioscoreae* (complejo de hongos) y la 6328 moderadamente resistente a YMV y *Colletotrichum* spp.

5 CONCLUSIONES

1. Existe variabilidad en las 59 accesiones de *Dioscorea* spp de la colección del CATIE en la caracterización fenotípica y en las 46 caracterizadas genotípicamente.
2. Los descriptores morfológicos cuantitativos y cualitativos, permitieron separar en 6 grupos las accesiones de *Dioscorea* spp que indican la existencia de características diferentes entre las accesiones estudiadas.
3. Las 60 variables elegidas para la caracterización morfológica (cuantitativas y cualitativas), solamente resultaron 10 cuantitativas y 23 cualitativas discriminantes entre las accesiones de *Dioscorea* spp estudiadas.
4. Las 6 combinaciones de “enzima/primer” utilizadas para la caracterización molecular (AFLP), permitieron la observación de bandas definidas o específicas en algunas amplificaciones de los ADN estudiados.
5. La combinación de la información de caracterización morfológica y marcadores moleculares conformó 6 grupos. Entre ellos un grupo conformado por accesiones de *D. alata* procedentes de Puerto Rico y con congruencia de 85% entre los grupos formados a partir de datos morfológicos y moleculares.
6. Existe mucha variabilidad morfológica y molecular entre accesiones evaluadas.

6 RECOMENDACIONES

1. Incluir en el estudio las características para clasificar las especies y así clasificar las accesiones que cuenten con más de una repetición, como por ejemplo: modalidad de trepado de la planta, relación entre los tubérculos subterráneos, tipo de corno, forma del tubérculo y color del tubérculo.
2. Se recomienda el uso de los descriptores discriminantes encontrados en este estudio, así como en estudios previos para hacer caracterizaciones morfológicas ya que facilitan la tomas de datos en campo.
3. Se recomienda la estandarización del protocolo de extracción y de AFLP para este cultivo.
4. Trabajar con un menor número de accesiones para las pruebas de caracterización morfológica y molecular ya que permitiría un mejor manejo de las muestras y toma de datos, previo a su utilización.
5. Complementar este con evaluaciones de campo para enfermedades/plagas, que permitan completar los estudios del banco de germoplasma y de esta manera proporcionar una nueva alternativa a los productores.
6. Reproducir suficiente material vegetal (semillas) para evaluar una mayor cantidad de plantas por accesiones establecidas en el ensayo de campo; así como, la evaluación de algunos descriptores que requieren de la destrucción del material.
7. Se recomienda la evaluación del resto de los descriptores de *Dioscorea* spp. de la sección del tubérculo; con el fin de identificar las especies e identificar sus buenas característica para ofrecerlas a productores.

7 LITERATURA CITADA

- Agroconocimiento. 1977. Revista de Información y Orientación Agropecuaria. Año 2. Nos. 21 y 22.
- Aguilar, E. (s/f). Guía del cultivo de ñame cv. Diamante 22. 5 p.
- Asha, K.I.; Nair,G.M; Padmesh M; Nair M.C; Reji, J.V. 2006. Interrelaciones entre las especies de *Dioscorea*, reveladas por los rangos morfológicos y de marcadores de RAPD. Consultado 28 ene. 2009. Disponible en: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijpgr&volumen=19&issue=1&article...>
- Basil, J. 2007. Diversidad genética en poblaciones de *Swietenia macrophylla* King (Meliaceae) en Costa Rica y Bolivia. Turrialba, Cartago, C R. 88 p.
- Becerra, V.; Paredes, M. 2000. Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. Agricultura Técnica v.60 n.3 jul. 2000. Consultado 3 dic. 2009. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S0365...script...>
- Bustamante, S.; Guzmán, M.; Buitrago, G. 2003. Caracterización molecular del germoplasma de ñame colombiano utilizando “DNA Amplificaron fingerprinting (DAF)” en condiciones radiactivas. Revista Colombiana de Biotecnología. vol.V, Número 002, Bogotá, Col. 57-63 p.
- Campos Q., H.; Seguel B.; I. 2000. Agro Sur. Biotecnología y Recursos genéticos vegetales. v.28 n° 1 Valdiviafene.
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. 2011. Resumen acumulado de datos hasta el 2010-CATIE. Consultado 8 enero 2012. Disponible en: http://www.catie.ac.cr/BancoMedios/.../acumulado_2011.xls
- Centro Internacional de la Papa, Perú. 1999. Raíces y Tubérculos en el Sistema Alimentario Mundial: Visión al 2020. Consultado 25 nov. 2009. Disponible en: <http://www.cipotato.org/publications/annual.../06.asp>
- Demey, J. R; Zambrano, A. Y; Fuenmayor, F. 2003. Relación entre Caracterizaciones o molecular y morfológica en una colección de yuca. *INCI*. dic. 2003, vol.28, no.12. 684-689p. Consultado 12 jun. 2009. Disponible en: <http://www.scielo.org.ve/scielo.php?...18442003001200004...>
- Domínguez, CE. 1982. Yuca: Investigación, Producción y Utilización. In Hershey, Cl; Amaya, A. Germoplasma de Yuca: Evolución, Distribución y Colección. P. 77-88.
- Ebert, A.W. (s/f). DBGERMO: un sistema exitoso de manejo de información para bancos de germoplasma. Consultado 4 ene. 2010. Disponible en http://www.catie.ac.cr/BancoConocimiento/N/noticias_sede_germoplasma/noticias_se

de_germoplasma.asp?IdObjetoSE=9565&CodIdioma=ESP&Viene=1&CodSeccion=91&CodMagazin=29

- Falconer, D. 1981. Introduction to quantitative genetics. Logman, New York. 340 p.
- FAO. 2009. Segundo Proyecto de Informe sobre el estado de los recursos del mundo para la Alimentación y la Agricultura. Versión final. Comisión de Recursos Genéticos para la Alimentación y la Agricultura. Consultado 8 enero 2012. Disponible en: <http://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/017/ak528e.pdf>
- _____. 2010. Anuario estadístico de la FAO 2010 (en línea). Consultado 4 ene. 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-production/es/>
- _____. 2010. Anuario estadístico de la FAO 2010 (en línea). Consultado 4 ene. 2012. Disponible en: <http://www.fao.org/economic/ess/ess-publications/ess-yearbook/ess-yearbook2010/yearbook2010-consumption/es/>
- Franco, T. (s/f). Recursos Naturales y Ambiente. Los bancos de germoplasma de las Américas. No 53: 81-84.
- González, D. 1998. Marcadores moleculares para los estudios comparativos de la variación en ecología y sistemática. Rev. Mex. Mic. 14: 1-21p (1998).
- González M, Y. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. Turrialba, Cartago, C R. 89 p.
- Hural, D. 2005. Cultivo de Yuca (*Manihot esculenta* C.). Ministerio de Agricultura de Perú. INIA. Consultado 13 nov. 2009. Disponible en http://www.inia.gob.pe/boletin/bcit/boletin0002/index.htm#cultivo_donoso.
- InfoStat. 2009. InfoStat versión 2009. Manual del Usuario, Software Estadístico. Grupo InfoStat, FCA, Universidad de Córdoba, Argentina. Consultado 23 nov. 2009. Disponible en: <http://www.infostat.com.ar>
- INTA/EEAP. (s/f). Banco de Germoplasma. Consultado 9 dic. 2009. Disponible en <http://www.inta.gov.ar/Pergamino/investiga/grupos/bcogermoplasma/banco.htm>
- Interletras. Manual del exportador de frutas, hortalizas y tubérculos en Colombia.2000. (En línea). Consultado: 8 jul. 2011. Disponible en: <http://interletras.com/manualCCI/Tuberculos/NAME/name02.htm>
- IPGRI/IITA. 1997. Descriptores para ñame (*Dioscorea* spp.) Instituto Internacional de Agricultura Tropical. Ibadán, Nigeria/Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Roma. Italia.
- Jiménez, D; Hernández, R. 2009. Manual Técnico del Cultivo de ñame. IDIAP. Panamá. 44p.

- Johnson, E; Romero-Severón, J; Astorga, C; Casanoves, F; Di Rienzo, J; Jackson, S; Meneses, A; Stuart, J. 2005. Aplicación de las Herramientas Moleculares en las Ciencias Agrícolas y Forestales. In Astorga, CD; Quirós, SO. 2004. Protocolo para la extracción de ADN de café y otras especies vegetales utilizado en los laboratorios de biología molecular (2004, CATIE. CR).
- Johnson, R.A.; Wichern, D.W. (1998). *Applied multivariate statistical analysis*. 4th Ed. Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ.
- López V, Y.E. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 118 p.
- Mahalakshmi, V; Ng, P.; Atalobhor, J; Ogunsola, D; Lawson, M; Ortiz, R. 2007. Desarrollo de un ñame de África Occidental *Dioscorea* spp. colección básica. Consultado 29 ene. 2009. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/18406q5729776442/>
- Malapa, R; Arnau, G; Noyer, J.L.; Lebot, V. 2005. Genetic diversity of the greater yam (*Dioscorea alata* L.) and relatedness to *D. nummularia* Lam. And *D. transversa* Br. As revealed with AFLP markers.
- Martínez, J. 2007. Caracterización morfológica y molecular del Cacao Nacional Boliviano y de selecciones élites del Alto Beni, Bolivia. Turrialba, Cartago, CR. 87 p.
- Mignouna, H.D; Dansi, A; Zok, S. 2002. Isoenzimáticos y la diversidad morfológica de los ñames cultivados de *Dioscorea cayenensis* y *D. rotundata* de Camerún. Consultado 23 ene. 2009. Disponible en: <http://www.springerlink.com/content/v1tl53117413407u/?p=1204c0ca29794a1d96fdac65...>
- Mignouna, H.D; Abang.M.M; Fagbemi, S.A. 2003. Caracterización de germoplasma: Una evaluación comparativa de las pruebas de marcadores moleculares (AFLP, RAPD, SSR) para el ñame blanco (*D. rotundata*). Consultado 23 ene. 2009. Disponible en: <http://www.ingentaconnect.com/content/aab/annals/2003/00000142/00000003/art00002>
- Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos. Segunda edición rev. San José, CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 408p.
- Tamiru, M.; Becker, H.C.; Maass, B. L. 2007. Genetic diversity in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. *Crop Science*, Vol. 47, July- August 2007. 1744-1753 p.
- Peakall, R.; Smouse P.E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. 6, 288-29. Consultado 4 dic. 2009. Disponible en: <http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1471-8286.2005.01155.x>
- Phillips-Mora, W; Rodríguez, H; Fritz, P J. 1995. Marcadores de ADN: Aplicaciones y Protocolos de Trabajo. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 96 p.

- _____. 1998. 2. Congreso Nacional de Estudiantes del Sector Agropecuario Costarricense. Guácimo (Costa Rica). 1-4 May 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en agricultura. Memoria. Asociación de Estudiantes del Sector Agropecuario Costarricense, San José (Costa Rica). Colegio de Ingenieros Agrónomos, San José (Costa Rica). IICA, San José (Costa Rica). 77-88. 280 p.
- Rao, R; Riley, K. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resours. Plant Genetic Resources Newsleeter 97:3/19
- Rodríguez, A; Vásquez J; García, M; Fonseca, M; Borges, M; Aguilera, N; Meneses, S; Infante, Z. 2009. Plant Genetic Resources Newsletter. Conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea alata* L. por crecimiento mínimo. Issue No. 133, 8-12 p. Consultado 7 jun. 2009. Disponible en: http://www.bioversityinternational.com/.../pgrnewsletter/article_fr.asp?
- Rodríguez, W. 1994. Las Raíces y Tubérculos Tropicales como Alternativa de Producción en C R. Boltec 27(1): 67 – 79 p
- Rogers, DJ; Fleming, HS. 1973. A Monograph of *Manihot esculenta* with an Explanation of the Taximetric Methods Used. Economic Botany. The University of Colorado. EU. 113 p.
- Rojas, M.; Concepción, J.; Von Chong, K. (s/f). Manejo Integral del Cultivo de Ñame Mecanizado (2009. *Dioscorea alata*) Una Opción para la Producción Sostenida. Consultado 9 dic. 2009. Disponible en <http://www.fao.org/.../manejo-integral-del-cultivo-de-ñame-mecanizado-dioscorea-alata-una-opción-para-la-producción>
- Sánchez, M.; Fernández, H.; Gracia, C. 2008. Caracterización Agromorfológica de cultivares de ñame (*Dioscorea* spp.), procedentes del Suroccidente de Guatemala y efecto de si variabilidad como espesante de salas caseras. Informe Final. Universidad de San Carlos Guatemala. 65 p.
- Sauer, C. 1952. Agricultural origins and dispersals. New York, The American geographical society . EU. 110 p.
- Scott, G.J; Rosegrant, M.W; Ringler, C. 2000. Raíces y tubérculos para el siglo 21> tendencias, proyecciones y opciones políticas. Resumen 2020 N| 66.
- SIIM/CNP, CR.2009. Análisis de mercado de mercados. Ñame (en línea). San José, CR. Consultado 10 jul. 2011. Disponible en <http://www.cnp.go.cr/php-mysql/admin/KTML/uploads/files/boletines /Monitoreo-ame-02-2011.pdf>
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Reijans, M.; Van de Lee, T.; Hornes, M., Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M.; Yzabeau, M. 1995. Nucleic Acid Res. 23: 4407-4414.

8 ANEXOS

Anexo 1. Descriptores morfológicos para el cultivo de ñame (*Dioscorea* spp.)

DESCRPTORES DE LA PLANTA	
CARACTERÍSTICAS DEL TALLO	
TALLO JOVEN	
Días hasta el brote	___ (Número de días entre la plantación y el brote)
Longitud del tallo joven	_____ (Registrada 20 días después del brote)
Número de entrenudos en el tallo joven	_____ (Contados 20 días después del brote)
Color del tallo joven (Observado 20 días después del brote)	1=Verde; 2=Verde morado; 3=Verde marrón; 4=Marrón oscuro; 5=Morado; 6=Otro (especificar)
Ausencia/presencia de alas en el tallo joven	1= Ausente; 2=Presente
Color de las alas del tallo joven (Observado 20 días después del brote)	1=Verde; 2=Verde con bordes morados; 3=Morado; 4=Otro (especificar)
Ausencia/presencia de pelos en el tallo joven	1= Ausente; 2=Presente
Ausencia/presencia de espinas en el tallo joven	1= Ausente; 2=Presente
TALLO MADURO	
Tipo de planta	1=Enana; 2=Tipo arbusto; 3=Trepadora
Hábito de trepado de la planta	1=No; 2=Sí
Altura del tallo maduro	1 =<2 m; 2=2-10 m; 3=>10 m-
Número de tallos maduros por planta	_____ (Promedio de 5 plantas)
Color del tallo maduro	1=Verde; 2=Verde morado; 3=Verde marrón; 4=Marrón oscuro; 5=Morado; 6=Otro (especificar)
Número de entrenudos hasta la primera ramificación	_____ (Promedio de 5 plantas)
Número de ramificaciones en el tallo maduro	Registrar el número de ramas sobre la superficie
Diámetro del tallo maduro	_____ (Medido a 15 cm sobre la base de la planta)
Longitud de los entrenudos en el tallo maduro	_____ (Registrada a una altura de 1 m.) Promedio de 5 plantas
Ausencia/presencia de alas en el tallo maduro	1= Ausente; 2=Presente
Posición de las alas en el tallo maduro	1= En la base; 2=Sobre la base
Tamaño de las alas del tallo maduro (Registrado a una altura de 1 m)	1=<1 mm; 2=1 - 2 mm; 3=> 2 mm
Color de las alas del tallo maduro	1=Verde; 2=Verde con bordes morados; 3=Morado; 4=Otro (especificar)
Pilosidad del tallo maduro (2.4.8)	1=Escasa; 2=Densa
Ausencia/presencia de hojas escamadas en el tallo maduro	1= Ausente; 2=Presente
Posición de las hojas escamadas en el tallo maduro	1=Alternadas; 2=Opuestas; 3=Ambas; 4=Verticiladas
Espinas en la base del tallo	1=Pocas; 2=Muchas

maduro	
Espinas arriba de la base del tallo maduro	1=Pocas; 2=Muchas
HOJA JOVEN	
Primer brote de las hojas de la hoja joven	1=Temprano; 2=Tardío
Número de hojas jóvenes	_____ (Registrado 30 días después del brote)
Color de las hojas jóvenes	1=Amarillento; 2=Verde claro; 3=Verde oscuro; 4=Verde morado; 5=Morado; 6=Otro (especificar)
Color del borde de las hojas jóvenes	1=Verde; 2=Morado; 3=Otro (especificar)
Color del pecíolo de la hoja joven	1=Todo verde con la base morada; 2=Todo verde con la junta de la hoja morada; 3=Todo verde, morado en ambas puntas; 4=Todo verde morado con base morada; 5=Todo verde morado con junta de la hoja morada; 6=Todo verde morado, ambas puntas moradas; 7=Verde; 8=Morado; 9=Verde marrón; 10=Marrón; 11=Marrón oscuro; 12=Otro (especificar)
Pilosidad del haz/envés de la hoja joven	1=Haz; 2=Envés; 3=Ambas
HOJA MADURA	
Posición de las hojas maduras	1=Alternadas; 2=Opuestas; 3=Alternadas en la base/opuestas más arriba; 4=Otro (especificar)
Número de entrenudos hasta las hojas totalmente abiertas	_____ (Promedio de 5 plantas)
Tipo de hoja madura	1=Simple; 2=Compuesta
Borde de la hoja madura	1=Entero; 2=Serrado
Lobulado de las hojas maduras	1=Lobulado poco profundo; 2=Lobulado profundo
Número de folíolos en la hoja madura compuesta	1=Casi siempre tres (trifoliada) ; 2=Casi siempre cinco (quinada) ; 3=Más de cinco
Color de las hojas maduras	1=Amarillenta; 2=Verde clara; 3=Verde oscura; 4=Verde morada; 5=Morada; 6=Otro (especificar)
Pilosidad en el haz de la hoja madura	1=Escasa; 2=Densa
Pilosidad en el envés de la hoja madura	1=Escasa; 2=Densa
Forma de la hoja madura	1=Oval ; 2=Cordiforme; 3=Cordiforme larga; 4=Cordiforme ancha; 5=Sagitiforme larga; 6=Sagitiforme ancha; 7=Hastada ; 8=Otro (especificar)
Forma del ápice de la hoja madura	1=Obtuso; 2=Agudo; 3=Emarginado; 4=Otro (especificar)
Ondulación de la hoja madura	1=Poca; 2=Mucha
Posición de la parte más ancha de la hoja madura	1=Tercio superior; 2=Medio; 3=Tercio inferior
Longitud del pecíolo de la hoja madura	1= ≤ 5 cm; 2=6 - 9 cm; 3= ≥ 10 cm
Pilosidad del pecíolo de la hoja madura	1=Escasa; 2=Densa
Color del pecíolo de la hoja	1=Todo verde con la base morada; 2=Todo verde con la

madura	junta de la hoja morada; 3=Todo verde, morado en ambas puntas; 4=Todo verde morado con base morada; 5=Todo verde morado con junta de la hoja morada; 6=Todo verde morado, ambas puntas moradas; 7=Verde; 8=Morado; 9=Verde marrón; 10=Marrón; 11=Marrón oscuro; 12=Otro (especificar)
Espinosidad del pecíolo de la hoja madura	1=Escasa; 2=Densa
Ausencia/presencia de estípulas en la hoja madura	1=Ausente; 2=Presente
FLORACIÓN	
Floración	1=Sin floración ; 2=Floración en algunos años; 3=Floración todos los años
Días hasta la floración después del brote	_____ días
Sexo	1=Femenino; 2=Masculino; 3=Femenino y masculino (predominantemente femenino); 4=Masculino y femenino (predominantemente masculino)
Posición de la inflorescencia (En relación con las ramas)	1=Hacia arriba ; 2=Hacia abajo
Número de inflorescencias por planta (Observado en 10 plantas)	1= ≤ 10 ; 2= 11 - 29; 3= ≥ 30
Olor de la inflorescencia	1=No; 2=Sí
Tipo de inflorescencia	1=Espiga; 2=Racimo; 3=Panícula; 4=Otro (especificar)
Longitud media de la inflorescencia	1= ≤ 15 cm; 2= 6 - 10 cm; 3= 11 cm; 4= ≥ 16 cm
Número de inflorescencias por entrenudo	_____ (Promedio de 5 plantas)
Número de flores femeninas por inflorescencia	1= ≤ 10 ; 2= 11 - 25; 3= 26 - 100; 4= ≥ 101
Color de la flor	1=Morada; 2=Blanca; 3=Amarillenta ; 4 =Otro (especificar)
Longitud de la flor femenina	1 = $\leq 2,5$ cm; 2= 2,6 - 5 cm; 3 = $\geq 5,1$ cm
Diámetro de la flor femenina	_____ [mm] (Promedio de 5 plantas)
Diámetro de la flor masculina	1 = ≤ 2 mm; 2=3 - 5 mm; 3= > 5 mm
Longitud de la flor masculina	_____ [cm] (Promedio de 5 plantas)
FRUTO	
Formación del fruto	1=No; 2=Sí
Desarrollo del fruto	1=Casi siempre bien desarrollado; 2=Casi siempre poco desarrollado
Posición del fruto	1=Hacia arriba; 2=Hacia abajo
Forma del fruto	1=Longitud y anchura iguales ; 2=Alargado; 3=Cápsula trilobulada
Tamaño del fruto	1= < 3 cm; 2= ≥ 3 cm
Pilosidad del fruto	1=Escasa; 2=Densa
Ausencia/presencia de cera en el fruto	1=Ausente; 2=Presente
Ausencia/presencia de manchas oscuras dentro del fruto	1=Ausente; 2=Presente

Ausencia/presencia de semillas en el fruto	1=Ausente;2=Presente
Forma de la semilla	1= Alargada-oblonga; 2=Redonda; 3=Otro (especificar)
Estructura del ala de la semilla	1=Ala alrededor de todo el embrión; 2=Ala en uno u otro lado del embrión; 3= Ala sólo en un lado del embrión
Número de semillas totalmente desarrolladas	_____ (Promedio de 5 plantas)
TUBÉRCULOS AÉREOS	
Ausencia/presencia de tubérculos aéreos	1= Ausente; 2=Presente
Forma del tubérculo aéreo	1=Redondo; 2=Oval; 3=Irregular (no uniforme) 4=Alargado
Diámetro del tubérculo aéreo	1 = ≤1 cm; 2=2 - 5 cm; 3=6 - 10 cm; 4=>10 cm
Color de la piel del tubérculo aéreo	1= Grisáceo; 2= Marrón claro; 3= Marrón oscuro; 4= Otro (especificar)
Textura de la superficie del tubérculo aéreo	1= Lisa; 2=Rugosa; 3=Áspera
Ausencia/presencia de protuberancias en el tubérculo aéreo	1= Ausente; 2= Presente
Espesor de la piel del tubérculo aéreo	1= Fina ; 2= Gruesa
Color de la pulpa del tubérculo aéreo	1= Blanco; 2= Blanco amarillento o blanco viejo; 3= Amarillo; 4= Naranja; 5= Morado claro; 6= Morado; 7= Morado con blanco; 8= Blanco con morado; 9= Exterior morado/interior amarillento; 10= Otro (especificar)
TUBÉRCULOS SUBTERRÁNEOS	
Ausencia/presencia de tubérculos subterráneos	1= Ausente; 2= Presente
Tipo de tubérculos subterráneos	1=Tubérculo; 2=Rizoma
Madurez después del brote (tubérculos) Indicar los meses	1= Hasta seis meses; 2= 7 a 8 meses; 3= 9 a 10 meses

Anexo 2. Protocolo Método de CTAB para la Extracción de ADN de *Dioscorea* spp. (Doyle y Doyle 1987) modificado por Heidy Villalobos (2011)

1. Cortar el tejido de hoja limpio (sin manchas ni puntos amarillos) entre 2 a 4 cm de largo por 2 a 3 cm de ancho; idealmente sin vena media gruesa.
2. Macerar con nitrógeno líquido en un mortero limpio (limpiado con alcohol al 70%) hasta obtener un polvillo. No demorar mucho en el proceso de maceración.
3. Agregar 2 ó 3 ml de Buffer de extracción 2% y continúe macerando hasta ver una pasta formada y poner en hielo. Lavar bien el mortero, añadiendo hasta obtener un volumen de 5 a 7 ml de Buffer de Extracción.
4. Agregar una punta de espátula de PVP-40 y 50 ó 70 μ l de β -mercaptoetanol. Agitar bien por inversión e incubar por 40 min a 50°C en Baño María. Agitar por inversión cada 5 min.
5. Sacar los tubos del Baño María y dejar refrescar por 3 ó 5 min. Para enfriar lentamente. Agregar 3 ó 4 ml de cloroformo-octanol (24:1) e invertir 3 min. Abrir la tapa para liberar la presión.
6. Centrifugar 20-25 min. entre 6000 y 8000 rpm en la centrifuga a 4°C. se deben balancear los tubos, cerrarlos bien, subir de 2000 en 2000 las rpm y colocar los tubos en posiciones opuestas.
7. Sacar los tubos con mucho cuidado para no romper las fases acuosa y orgánica.
8. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un tubo limpio y repetir el paso 4.
9. Transferir solamente la fase acuosa a un tubo limpio estéril de 15 ml.
10. Precipitar los ácidos nucleicos presentes en la fase acuosa con $\frac{1}{2}$ volumen de cloruro de sodio 5M y 2.5 volumen de etanol absoluta. Invertir el tubo hasta ver presentes los ácidos nucleicos totales. De ser contrario dejar toda la noche a 4°C.

Resuspensión

11. Centrifugar a 12000 rpm por 10 min.
12. Botar el sobrenadante.
13. Lavar con etanol al 70% y dejarlo por 5 min.
14. Eliminar el sobrenadante.
15. Dejar secar por 3 ó 5 min.
16. Agregar agua destilada desionizada estéril y poner en un block por 10 min. A 37°C.
17. Resuspender.
18. Tomar una muestra de 5 a 8 µl de ADN con 3 µl de buffer de corrida.
19. Correr en gel de agarosa al 0.8% aproximadamente 30 min. a 90 voltios.
20. Precipitar los positivos en 1/10 volumen de acetato de sodio 3M más 2.5 volumen de etanol absoluto y guardar a -20°C.

Anexo 3. Protocolo para la purificación del ADN con RNasa A.

Purificación del ADN

1. Tomar 100 µl de muestras y agregar 3 µl de RNasa A 10 µg/ml en la concentración.
2. Incubar 30 min. a 37°C.
3. Agregar otros 3 µl de RNasa A e incubar por 30 min. a 37°C.
4. Agregar 50 µl de fenol equilibrado y cloroformo (25:25) y mezclar muy bien por inversión.
5. Centrifugar 5 min. a 8000 rpm.
6. Transferir el sobrenadante a un Eppendorf nuevo.
7. Precipitar con 1/10 volumen de ácido de sodio 3M más 2.5 volumen de etanol absoluto.

Nota: La mezcla fenol equilibrado: cloroformo es de 25 µl de cada reactivo. Son 50 µl si la muestra está resuspendida en 100 µl de agua estéril.

Anexo 4. Preparación de Buffer de Extracción CTAB 2%

Preparación de Buffer de Extracción

1. Alistar en un beaker o probeta grande para 100 ml lo siguiente:

Sustancia	Volumen
Tris-HCl pH= 7.6 1M	10 ml
EDTA 0.5M	4 ml
NaCl 5M	30 ml
CTAB 10 %	20 ml

2. Ajustar con agua bidestilada al volumen final de 100 ml el volumen obtenido de 64 ml de las sustancias.
3. Autoclavar el Buffer de extracción.

Anexo 5. Protocolo de AFLP de Invitrogen modificado por Federico Albertazzi (2011)

I. Digestión del ADN a partir de reactivos con altas concentraciones

1. Preparación de las mezclas de digestión

Mezcla de digestión

Producto	Cantidad por tubo de reacción
Agua destilada	0.5 µl
5X buffer reacción	2.0 µl
ADN muestra	7.0 µl
<i>EcoR1/Mse1</i>	0.5 µl
Vol. Final	10.0 µl

2. Mezclar bien la mezcla de master mix de digestión.
3. Distribuir las mezcla dentro de los tubos de 0.2 ml estériles, con ADN a una concentración de 50ng/µl aproximadamente.

4. Efectuar el siguiente programa de digestión en el termociclador:

1. 37°C 2 horas.
2. 70°C 15 minutos.
3. 4°C 5 minutos.

II. Ligación

1. Preparación de la solución adaptadora.

Producto	Cantidad por tubo de reacción
ADN digerido	10 µl
Solución adaptadora	9.5 µl
T4 ligasa	0.5 µl
Vol. Final	20.0 µl

2. Mezclar bien el master mix y colocar la cantidad correspondiente en cada microtubo de 0.2 µl.

3. Efectuar el siguiente programa de ligación en el termociclador:

1. 20°C 1 hora.
2. 15°C 1 hora.
3. 4°C por tiempo indefinido.

Nota: Después de diluidas las muestras se deben almacenar a -20°C.

Importante: En esta fase se debe preparar un gel de agarosa a 0.8% para realizar la verificación de la reacción de digestión-ligación. Utilizar el Buffer de migración TBE 1X y en cada pozo del gel colocar 4 µl del producto de la digestión-ligación más 3 µl de Bromofenol azul (Glicerol), al 50%.

III. Preamplificación

Debe de utilizar las diluciones de ADN 1:5 con las muestras después de la ligación y señalar los tubos adecuadamente.

1. Preparación de la mezcla de preamplificación.

Producto	Cantidad por tubo de reacción
Mix preamplificador	8.0 μ l
10X Buffer PCR	1.0 μ l
Taq polimerasa	0.1 μ l
ADN diluido de ligación	3.0 μ l
Vol. Final	11.6 μ l

2. Mezclar bien el master mix antes de colocar la muestra en los tubos estériles.
3. Efectuar el siguiente programa de preamplificación:
 1. 94°C 30 segundos
 2. 56°C 1 minuto
 3. 72°C 1 minuto. Repetido por 20 ciclos.
4. Verificación de la preamplificación: se toman 4 μ l del producto de la preamplificación, más 3 μ l de Bromofenol, y se coloca en un gel de agarosa 0.8% para la verificar la presencia de productos de la preamplificación como especie de barrido.

IV. Amplificación

Del producto de la preamplificación, hacer una dilución de 1:50. Rotular bien los microtubos de 0.2 µl. y almacenar el resto de la dilución a -20°C.

1. Preparación de la mezclas de amplificación.

Producto para Master Mix 1	Cantidad por tubo de reacción
Primer Eco	0.25 µl
Primer <i>Mse</i>	2.25 µl
Vol. Final	2.50 µl

Producto para Master Mix 2	Cantidad por tubo de reacción
Agua bio-destilada	3.95 µl
10X PCR	1.0 µl
Taq polimerasa	0.05 µl
Vol. final	5.0 µl

Producto	Cantidad por tubo de reacción
ADN preamplificado diluido (1:10 y 1:25)*	3.00 µl
Vol. final de amplificación	10.50 µl

* Depende de la combinación y las muestras. Hacer prueba de combinaciones con muestras al azar.

2. Mezclar bien los master mix antes de servirlos.
3. Efectuar el siguiente programa:
 1. 94°C 30 segundos.
 2. 65°C 30 segundos. Por 12 ciclos disminuyendo 0.7 por ciclo.
 3. 72°C 60 segundos.
 4. 94°C 30 segundos.
 5. 56°C 30 segundos. Por 32 ciclos.
 6. 72°C 60 segundos.
 7. 4°C 5 minutos.
4. Después de la amplificación agregar 20 µl de formamida para almacenarlo a -20°C y luego migrarlo en un gel de poliacrilamida al (6% ó 8%).

Anexo 6. Preparación del gel grande de Acrilamida 4% (19:1)

Pesar las siguientes sustancias para un gel de 4%

Sustancias	Cantidad para un gel de 4%
Acrilamida (19:1)	12.0 ml
Urea	25.2 g
10X Buffer	6.0 ml
Agua bio-destilada estéril	20.0 ml
APS 10%	340 μ l
TEMED	34 μ l

Anexo 7. Tinción de Plata para Geles grandes de Acrilamida

1. Colocar en un vaso químico de plástico 700 ml de ácido acético 7.5% por 20 min.
(No desechar el ácido acético porque lo usará en el paso #6).
2. Lavar con agua desionizada destilada dos veces por 2 min.
3. Incubar por 20 min. en 700 ml de nitrato de plata más 900 μ l de formaldehído.
4. Lavar una vez con agua desionizada destilada por 30 segundos.
5. Incubar en 700 ml de revelador (600 ml de carbonato de sodio + 1800 μ l de formaldehído + 300 μ l de tiosulfato de sodio). El revelador debe estar siempre frío a 4°C ó -10°C. Incubar hasta ver las bandas al gusto.
6. Eliminar el revelador y agregar los 600 ml del ácido acético (el del paso #1) por 15 min.
7. Lavar en agua desionizada destilada por 5 min.

Anexo 8. Prueba gDGC multivariadas de las variables cuantitativas completas

Cuadro de Análisis de la Varianza (Roy)

F.V.	Estadístico	F	gl (num)	gl (den)	p
Grupos Cuanti	15.31	73.49	10	48	<0.0001

Prueba Hotelling Alfa=0.05

Error: Matriz de covarianzas común gl: 53

Grupos

Cuanti	DIBRO	LONTAJO	ENTAJO	NUTAMA	ENTPRIRAM	NURAMTAMA	DIATAMA	LONANTALMA	NUMHOJOV	NUMENTHO	n	
4	20.67	154.44	14.33	1.67	1.67	3.67	8.00	27.67	2.00	2.67	3	A
5	4.31	76.90	9.88	2.25	0.44	5.19	4.83	12.34	2.63	0.62	12	B
6	9.67	77.58	9.50	2.00	12.33	1.67	3.86	20.17	0.00	12.33	11	C
1	30.57	53.07	8.86	3.36	0.50	6.93	5.47	15.27	0.29	1.57	14	D
2	0.00	101.23	15.42	2.75	0.00	4.42	5.39	13.77	9.58	0.67	3	E
3	29.18	77.30	12.82	2.09	0.45	8.36	6.20	15.50	7.73	1.45	16	F

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Anexo 9. Listado de las accesiones de *Dioscorea* spp. del CATIE, analizadas con marcadores moleculares AFLP

<i>Accesión</i>	<i>Género</i>	<i>Especie</i>	<i>Procedencia</i>	<i>Fecha de recolección</i>
6322 A	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6322 B	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>		
6322 C	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>		
6323	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6324	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6327 A	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6327 B	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>		
6328	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6344	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6346	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6347	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Puerto Rico	01/02/1977
6348 B	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>		
6348 C	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>		
6569	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Honduras	01/03/1977
6664	<i>Dioscorea</i>	<i>esculenta</i>	Puerto Rico	01/04/1977
6674	<i>Dioscorea</i>	<i>dumetotum</i>	Puerto Rico	01/04/1977
7064	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Barbados	01/06/1977
7066	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Desconocido	01/06/1977
7067	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Desconocido	01/06/1977
7079	<i>Dioscorea</i>	<i>cayenensis</i>	Guadaloupe	01/06/1977
7088	<i>Dioscorea</i>	<i>bulbifera</i>	Estados Unidos	01/06/1977
7231	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Panamá	01/07/1977
7297	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7311	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7333	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7356	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/07/1977
7363	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Panamá	01/07/1977
9476	<i>Dioscorea</i>	<i>pentaphylla</i>	Puerto Rico	01/12/1978
10009	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/11/1979
10715 A	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Panamá	01/01/1980
10718	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
10722	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
10733	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Panamá	01/01/1980
10739	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/01/1980
11425	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Guatemala	01/04/1980
11684	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Desconocido	01/04/1980
11685	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Desconocido	01/04/1980
11690	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Desconocido	01/04/1980
11693	<i>Dioscorea</i>	<i>trífida</i>	Desconocido	01/04/1980
11735	<i>Dioscorea</i>	<i>alata</i>	Costa Rica	01/06/1980
12174	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Honduras	01/12/1980
12451	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
12460	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
12470	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Panamá	01/09/1981
13175	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/11/1981
13312	<i>Dioscorea</i>	<i>sp.</i>	Costa Rica	01/02/1982