

**CENTRO AGRONOMICO TROPICAL DE INVESTIGACION Y ENSEÑANZA**  
**PROGRAMA DE ENSEÑANZA PARA EL DESARROLLO Y LA CONSERVACION**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**

**CARACTERIZACION MORFOLOGICA Y MOLECULAR DE LA  
DIVERSIDAD GENETICA DE LA COLECCION DE *Pachyrhizus*  
*tuberosus* (LAM.) SPRENG. DEL CATIE**

**POR**

**CESAR GUILLERMO TAPIA BASTIDAS**



Turrialba, Costa Rica  
**1998**

CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y ENSEÑANZA  
PROGRAMA DE ENSEÑANZA  
AREA DE POSTGRADO

**“CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA  
DIVERSIDAD GENÉTICA DE LA COLECCIÓN DE *Pachyrhizus  
tuberosus* (LAM.) SPRENG. DEL CATIE”.**

Tesis sometida a la consideración del Comité Técnico Académico del Programa de Estudios de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, para optar el grado de

**MAGISTER SCIENTIAE**

por

**CÉSAR GUILLERMO TAPIA BASTIDAS**

CATIE

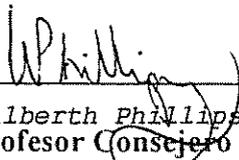
Turrialba, Costa Rica

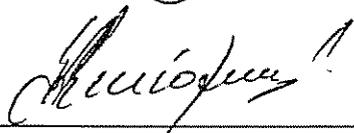
1998

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma, por la Dirección de la Escuela de Postgrado en Ciencias Agrícolas y Recursos Naturales del CATIE y aprobada por el Comité Asesor del estudiante como requisito parcial para optar al grado de:

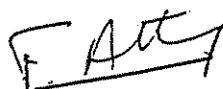
*MAGISTER SCIENTIAE*

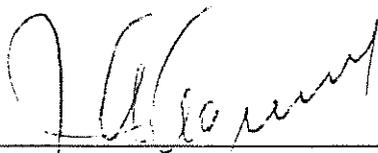
**FIRMANTES:**

  
\_\_\_\_\_  
*Wilberth Phillips*  
**Profesor Consejero**

  
\_\_\_\_\_  
*Gustavo Enriquez*  
**Miembro Comité Asesor**

  
\_\_\_\_\_  
*Francisco Mesén*  
**Miembro Comité Asesor**

  
\_\_\_\_\_  
*Francois Anthony*  
**Miembro Comité Asesor**

  
\_\_\_\_\_  
*Juan Antonio Aguirre*  
**Director y Decano de la Escuela de Postgrado**

  
\_\_\_\_\_  
*César Tapia Bastidas*  
**Candidato**

## **DEDICATORIA**

**A Dios y a la Dolorosa del Colegio por acogerme bajo su manto**

**A mi Esposa Rita Jeaneth y a mis hijos**

**Ana Belén  
Nicole Alejandra  
Javier Guillermo**

**Con amor y gratitud por su comprensión**

**A mis Padres**

**Con cariño por sus esfuerzos y sabios consejos**

**A mis Suegros**

**Con gratitud por sus sacrificios**

**A mi Hermana y su Esposo**

**Con mucho cariño**

**A mis Sobrinos propios y políticos**

**Con amor**

## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a:

A Wilberth Phillips por su ayuda y amistad a lo largo de toda la investigación, revisión y edición de la tesis. De igual manera a los miembros del Comité Asesor por su apoyo en las diferentes áreas técnicas de la investigación.

Al personal de la Unidad de Biotecnología y Recursos Fitogenéticos del CATIE, por su desinteresada colaboración en la realización de la investigación; especialmente a Carlos Castillo por la ayuda en la toma de datos en campo y su valiosa amistad.

Al personal de Informática y Biblioteca del CATIE por su colaboración. Una especial mención para Jhonny Pérez por los consejos y ayuda en los análisis estadísticos.

A la Fundación de Ciencia y Tecnología de Ecuador (FUNDACYT), BID y Academic and Professional Programs for the Americas (LASPAU) por el financiamiento de mis estudios y administración de la beca. Un agradecimiento especial para Kim Killingsworth por el profesionalismo demostrado en su cargo.

Al Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP-Ecuador), al Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF), Dr. Michael Hermann (CIP-GTZ) y a la Escuela de Postgrado de CATIE, por brindarme la oportunidad de continuar mis estudios.

Por último, un especial agradecimiento para mis amigos en Ecuador y en el CATIE, con los cuales compartí alegrías y tristezas.

# CONTENIDO

	Pag.
CONTENIDO .....	v
RESUMEN .....	ix
SUMMARY .....	x
LISTA DE CUADROS .....	xi
LISTA DE FIGURAS .....	xiii
LISTA DE ANEXOS .....	xvi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Generalidades e importancia de <i>Pachyrhizus</i> .....	1
1.2. Objetivos del estudio .....	3
2. REVISIÓN DE LITERATURA .....	5
2.1. Botánica .....	5
2.2. Recursos Genéticos .....	6
2.2.1. Variabilidad genética de <i>P. tuberosus</i> .....	6
2.2.2. Caracterización de los genotipos .....	9
2.2.2.1. Caracterización morfológica .....	11
2.2.2.2. Caracterización molecular .....	14
2.2.2.2.1. Marcadores moleculares .....	14
2.2.2.2.2. Análisis PCR/RAPD .....	16
2.2.3. Relación entre la caracterización morfológica y molecular .....	20
2.3. Análisis Estadístico .....	23
2.3.1. Tamaño de muestra .....	23
2.3.2. Taxonomía numérica .....	23
2.3.3. Valor discriminante de los caracteres .....	26
2.3.4. Métodos estadísticos multivariados aplicados en biología molecular .....	27
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	30

	Pag.
4.1.2.4. Valor discriminante de los caracteres para separar entradas dentro de grupos	55
4.1.2.4.1. Caracteres cualitativos	55
4.1.2.4.2. Caracteres cuantitativos	57
4.1.2.5. Clasificación de los grupos	61
4.1.2.5.1. Forma del lóbulo central del foliolo principal de la hoja	61
4.1.2.5.2. Tipo de lóbulos en el foliolo principal de la hoja	65
4.1.2.5.3. Color de la pulpa de la raíz	66
4.1.2.5.4. Forma de la semilla	67
4.1.2.5.5. Velocidad de crecimiento del tallo principal	68
4.1.2.5.6. Color de los sépalos de la flor	69
4.1.2.5.7. Color del tallo	70
4.1.2.5.8. Hábito de crecimiento	71
4.1.2.5.9. Curvatura de la vaina	72
4.1.2.5.10. Color de la vaina inmadura	73
4.1.2.6. Estructura de los agrupamientos	74
4.2. FASE DE LABORATORIO	84
4.2.1. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN	84
4.2.2. Amplificación del ADN (RAPDs)	87
4.2.3. Descripción del polimorfismo revelado	89
4.2.4. Caracterización de la colección de <i>P. tuberosus</i>	93
4.3. RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES	100
5. DISCUSIÓN	102
5.1. Fase de campo	103
5.2. Fase de laboratorio	111
5.3. Relación entre los marcadores morfológicos y moleculares	113
6. CONCLUSIONES	115

	<b>Pág.</b>
6.1. Fase de campo .....	115
6.2. Fase de laboratorio .....	118
6.3. Relación de los marcadores morfológicos y moleculares .....	119
7. RECOMENDACIONES .....	120
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	122
9. ANEXOS .....	130

1

TAPIA, C.G. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG. del CATIE. Tesis Mag. Sci., CATIE. Turrialba, Costa Rica. 157 p.

**Palabras claves:** caracterización, variabilidad genética, *Pachyrhizus tuberosus*, valor discriminante, RAPD, matriz de distancia, agrupamiento de Ward, dendograma, *bootstrap*.

## RESUMEN

*P. tuberosus* denominada comúnmente como jícama al igual que la especie más difundida del género (*P. erosus*), es una leguminosa tuberífera nativa de Sur América. Se la considera como un cultivo promisorio debido a su alto potencial de producción de materia orgánica para uso humano y animal. Posee rendimientos excepcionales de 150 t/ha y contenidos de proteínas de 3 a 5 veces más que otras raíces como yuca o camote. Fijadora de nitrógeno, además de poseer altos contenidos del insecticida natural "rotenona", que es una opción interesante para ser usada en agricultura orgánica y sistemas de producción.

El objetivo de esta investigación fue evaluar en el CATIE, Turrialba, Costa Rica, la diversidad genética de la colección de *P. tuberosus*, mediante la caracterización morfoagronómica y molecular de 31 entradas. Para la caracterización morfológica se utilizó una matriz de distancias entre entradas para un total de 70 caracteres cualitativos y cuantitativos, la cual sirvió para el análisis de agrupamiento jerárquico de Ward (1963). Las distancias entre y dentro de grupos se analizaron para los caracteres de mayor valor discriminante "D"; además se obtuvo el tamaño de muestra mínima y se analizó la variabilidad genética. Es así que la colección se clasificó en cuatro grupos: las ashipas (grupo 1 y 4), chuines (grupo 2) y jíquimas (grupo 3) identificándose entre grupos y entradas dentro de grupos 10 caracteres cualitativos y 7 cuantitativos con mayor poder discriminante, siendo la forma y tipo del lóbulo del foliolo de la hoja, color de la pulpa de la raíz, hábito de crecimiento, días a la floración y días a la madurez fisiológica, los caracteres más útiles para utilizarse en una descripción inicial. La muestra mínima para caracteres cualitativos fue de 1 a 3 repeticiones y para caracteres cuantitativos con una muestra mínima de 20 a 50 y una precisión aceptable, se identificó a la relación largo/ancho del foliolo principal de la hoja y días a la madurez fisiológica de la vaina. Las entradas con menor variabilidad genética para los caracteres cuantitativos fueron la longitud de la flor, ancho del estandarte, relación largo/ancho del foliolo de la hoja y días a la madurez fisiológica.

Para la caracterización molecular se usó marcadores RAPD y por medio de matriz de distancia, dendogramas, "*bootstrap*" y análisis discriminante canónico se determinó la variabilidad de la colección. Se identificaron 10 "primers", obteniéndose 32 polimorfismos, siendo 7 "primers" los que más aportaron para diferenciar entre grupos, encontrar duplicados, "mutaciones de etiqueta" y caracterizar los individuos. Además, se identificó la relación de los dos tipos de caracterización mediante correlaciones basadas en las matrices de distancias, lo cual permitió encontrar que la mejor relación con respecto a la matriz obtenida con marcadores moleculares fue con los caracteres cualitativos. Las herramientas utilizadas en esta investigación han proporcionado la información necesaria para caracterizar los individuos y, por lo tanto, la futura contribución y valoración en el mejoramiento genético

TAPIA, C.G. 1998. Morphologic and molecular characterization of the genetic diversity of CATIE's collection of *Pachyrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG. Thesis Mag. Sci., CATIE. Turrialba, Costa Rica. 157 p.

**Key words:** characterization, genetic variability, *Pachyrhizus tuberosus*, discriminating value, RAPD, distance matrix, Ward's grouping, dendogram, *bootstrap*.

## SUMMARY

*P. tuberosus* commonly called jícama, like *P. erosus*, the most widely distributed species of its kind; is a native leguminous tuber from South America. It is considered as a promising crop due to its high potential for producing biomass for human and animal consumption. Its yields are exceptional, up to 150 tons per hectare and it contains 3 to 5 times more proteins than other roots like cassava or sweet potato. It fixes nitrogen and moreover it contains high levels of "rotenona", a natural insecticide, that is an interesting option for use in organic agriculture as pest control.

The objective of this research was to evaluate the genetic diversity of CATIE's *P. tuberosus* collection in Turrialba, Costa Rica, by through a morphoagronomic and molecular characterization of 31 samples. For the morphologic characterization, a total of 70 qualitative and quantitative characters were included to desing distance matrix between samples. This was used to analize Ward's hierarchic grouping (1963). The distances between and within groups were analyzed for the characters of greater discriminating value " D "; in addition, the size of the minimum sample was obtained and the genetic variability analyzed. The collection was classified in four main groups: ashipas (groups 1 and 4), chuines (group 2) and jíquimas (group 3). Ten qualitative characters and seven quantitative characters with greater discriminating power were used to identify groups, and samples within groups. These characters were: the form and type of the lobe of the leaf's foliole, color of the root's pulp, growth habits, days to flowering and days to physiological maturity, the most useful characters to be used in an initial description. The minimum sample size for qualitative characters oscilated from 1 to 3 repetitions and for quantitative characters, a minimum sample of 20 to 50, within acceptable limits. The relation length/width of the leaf's main foliole was identified as were the days to physiological maturity of the pod. The samples with smaller genetic variability for the quantitative characters were the length of the flower, width of the vexillum, relation length/width of the leaf's foliole and the days to physiological maturity.

For the molecular characterization, RAPD markers were used and by means of the distance matrix, dendograms, "*bootstrap*" and canonical discriminate analysis, the variability of the collection was determined. Ten "primers" were identified obtaining 32 polymorphisms, being seven "primers" the ones that contributed the most to differentiate between groups, to find duplicates, " label mutations " and to characterize the individuals. In addition, the relationships within both types of characterization were identified by means of correlations based on the distance matrix, which allowed to find out that the best relation in regards to the matrix obtained with molecular markers were with the qualitative characters. The tools used in this research have provided the necessary information to characterize the individuals and, therefore, the future contribution and valuation in the genetic breeding.

## LISTA DE CUADROS

	Pag.
Cuadro 1. Distribución geográfica y características morfológicas relevantes de los chuines, ashipas y jíquimas. CATIE, 1998. ....	9
Cuadro 2. Detalle de las entradas de <i>P. tuberosus</i> que fueron evaluadas del Banco de Germoplasma de CATIE, 1998. ....	31
Cuadro 3. Lista de descriptores cualitativos de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	32
Cuadro 4. Lista de descriptores cuantitativos de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	33
Cuadro 5. Lista de “primers” evaluados para <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	40
Cuadro 6. Tamaño de muestra mínima de caracteres cuantitativos a diferentes límites de error según la fórmula de Steel y Torrie (1980) de la colección de <i>P. tuberosus</i> del CATIE, 1998. ....	47
Cuadro 7. Promedio (PROM.), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV) e índice de herencia ( $H^2$ ), de 32 caracteres de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	49
Cuadro 8. Valores promedios para 32 caracteres distintivos en tres grupos genéticos de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998.....	51
Cuadro 9. Distribución de las entradas por grupo, según el análisis de agrupamiento jerárquico de Ward. CATIE, 1998. ....	52
Cuadro 10. Caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	53
Cuadro 11. Caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	55
Cuadro 12. Caracteres cualitativos para separar entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> , según el valor discriminante “D”. CATIE, 1998 .....	56
Cuadro 13. Promedio, valor discriminante “D” y “Dw” para los caracteres cuantitativos, en el agrupamiento de entradas de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	58

Cuadro 14. Promedio del valor discriminante “D” y “Dw” para los caracteres cuantitativos de flor, tallo, hoja, vaina, semilla y raíz, en el agrupamiento de entradas de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	61
Cuadro 15. Frecuencias de las entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> según el estado de los caracteres cualitativos con mayor poder discriminante entre los agrupamientos jerárquicos de Ward. CATIE, 1998. ....	62
Cuadro 16. Caracteres cualitativos y cuantitativos similares y diferentes dentro de los cuatro grupos conformados de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	77
Cuadro 17. Estadísticas descriptivas para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	86
Cuadro.18. Análisis estadístico para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	86
Cuadro 19. Concentraciones de “primers” evaluados en la colección de <i>P. tuberosus</i> del banco de germoplasma del CATIE, 1998. ....	88
Cuadro 20. “Primers” polimórficos utilizados para la caracterización molecular de la colección de <i>P. tuberosus</i> del banco de germoplasma del CATIE, 1998. ....	90
Cuadro 21. Pruebas de $X^2$ para los RAPDs polimórficos y sus frecuencias de presencia y ausencia, con el coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998. ....	96
Cuadro 22. Relación de las matrices de distancias entre diferentes caracteres morfológicos y marcadores moleculares. CATIE, 1988. ....	101

## LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Fig. 1. Flujograma del análisis estadístico de los datos morfológicos de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	35
Fig. 2. Flujograma del análisis de los datos moleculares generados mediante la metodología RAPDs en la colección de <i>P. tuberosus</i> del CATIE, 1998. ....	42
Fig. 3. Flujograma del análisis de relación entre los datos morfológicos y moleculares de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998. ....	45
Fig. 4. Forma del lóbulo en el foliolo principal de la hoja de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	64
Fig. 5. Forma típica del lóbulo del foliolo central de la hoja en jíquimas, ashipas y chuines de la colección de <i>P. tuberosus</i> del CATIE, 1998. ....	64
Fig. 6. Tipo del lóbulo en el foliolo principal de la hoja de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	65
Fig. 7. Color de la pulpa de la raíz de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	66
Fig. 8. Forma de la semilla de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	67
Fig. 9. Velocidad de crecimiento del tallo principal de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	68
Fig. 10. Color de los sépalos de la flor de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	69
Fig. 11. Color del tallo de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	70
Fig. 12. Hábito de crecimiento de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	71
Fig. 13. Curvatura de la vaina de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	72
Fig. 14. Color de la vaina inmadura de cuatro grupos de genotipos de <i>P. tuberosus</i> evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998. ....	73

Fig. 15. Fenograma obtenido por el agrupamiento jerárquico de Ward de la colección de <i>P. tuberosus</i> basado en distancias genéticas de Gower (1967). CATIE, 1998 .....	75
Fig. 16. Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower (1967). CATIE, 1998. ....	76
Fig. 17. Fenograma de 12 entradas de <i>P. tuberosus</i> en el agrupamiento 1 (ashipas). CATIE, 1998 .....	79
Fig. 18. Fenograma de 7 entradas de <i>P. tuberosus</i> en el agrupamiento 2 (chuines). CATIE, 1998 .....	80
Fig. 19. Fenograma de 8 entradas de <i>P. tuberosus</i> en el agrupamiento 3 (jíquimas). CATIE, 1998 .....	82
Fig. 20. Fenograma de 4 entradas de <i>P. tuberosus</i> en el agrupamiento 4 (ashipas). CATIE, 1998 .....	83
Fig. 21. Determinación de la concentración de ADN del grupo de jíquimas mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998. ....	85
Fig. 22. Determinación de la concentración de ADN de ashipas mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998. ....	85
Fig. 23. Determinación de la concentración de ADN de chuines mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998. ....	85
Fig. 24. Ejemplo de amplificación de ADN de <i>P. tuberosus</i> con la técnica RAPDs y el "primer" UBC72 en muestras de chuines, jíquimas y ashipas de la colección de germoplasma. "R" o escalera es el ADN de referencia con fragmentos revelados cada 123 pb. CATIE, 1998. ....	91
Fig. 25. Ejemplo de amplificación de ADN de <i>P. tuberosus</i> con la técnica RAPDs y el "primer" OPH8 en muestras de chuines y ashipas de la colección de germoplasma. "R" o escalera es el ADN de referencia con fragmentos revelados cada 123 pb. CATIE, 1998. ....	92
Fig. 26 UPGMA dendograma y "Bootstrap" (2000 replicaciones) de la colección de <i>P. tuberosus</i> basado en distancias genéticas de Nei (1979). CATIE, 1998. ....	94

Fig. 27. Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998. ....	98
Fig. 28. Distribución de los individuos mediante el programa MATRIXPLOT Del software ntsys-pc, procedentes del análisis de correspondencia. CATIE, 1998. ....	99

## LISTA DE ANEXOS

	Pag.
Anexo 1. Lista de descriptores cualitativos de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	131
Anexo 2. Lista de descriptores cuantitativos de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	137
Anexo 3. Distancias calculadas por el método Gower (1967) del paquete estadístico SAS para 31 entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> . CATIE, 1998 .....	139
Anexo 4. Entradas del agrupamiento 1 y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	140
Anexo 5. Entradas del agrupamiento 2 y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	141
Anexo 6. Entradas del agrupamiento 3 y 4; y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	142
Anexo 7. Entradas del agrupamiento 1 y su promedio para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	143
Anexo 8. Entradas del agrupamiento 2 y su promedio para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	144
Anexo 9. Entradas del agrupamiento 3 y 4; y sus promedios para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998 .....	145
Anexo 10. Método CTAB-minipreparaciones. CATIE, 1998 .....	146
Anexo 11. Buffer de extracción 2X CTAB. CATIE, 1998 .....	147
Anexo 12. Buffer TE. CATIE, 1998. ....	147
Anexo 13. Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998 .....	148
Anexo 14. Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA). CATIE, 1998. ....	149

	<b>Pag.</b>
Anexo 15. Composición del bufer Bpb. CATIE, 1998 .....	150
Anexo 16. Protocolo para el análisis RAPD. CATIE, 1998.	150
Anexo 17. Preparación de "Master Mix". CATIE, 1998. ....	151
Anexo 18. Rendimiento de ADN de 31 entradas de <i>P. tuberosus</i> del banco de germoplasma del CATIE, 1998. ....	152
Anexo 19. Distancias calculadas por el método de Nei (1979) con el "software" Popgene para 31 entradas de la colección de <i>P. tuberosus</i> , CATIE, 1998 .....	153
Anexo 20 Costos de Procesamiento de Muestras (Método CTAB-Minipreparaciones). CATIE, 1998. ....	154
Anexo 21. Costos de análisis RAPD's y electroforesis. CATIE, 1998. ....	156

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 Generalidades e importancia de *Pachyrhizus*

De las aproximadamente 18000 especies que posee la familia de las Fabáceas o Leguminosas, al menos 25 son cultivadas para el consumo de sus raíces en varias partes del mundo (Vietmeyer, 1986). De acuerdo con la experiencia obtenida con algunas de ellas, este tipo de plantas constituye un importante recurso a ser explotado, debido a su alta capacidad de producción, su habilidad para fijar nitrógeno y su adecuado valor nutricional (National Academy of Sciences, 1979; Vietmeyer, 1986).

Dentro de este grupo, las especies pertenecientes al género *Pachyrhizus*, conocidas genéricamente como "jícamas", son una de las opciones más importantes y las que han tenido los avances más significativos en los últimos tiempos (Grum, 1990), sobre todo a partir de 1985 en que se estableció el "Yam Bean Project", proyecto dedicado exclusivamente al estudio de este género a nivel mundial.

De acuerdo con la clasificación más moderna realizada por Sørensen (1988), dentro de las que se conocen como jícamas se agrupan dos especies silvestres: *P. ferrugineus* y *P. panamensis*, y tres especies cultivadas: *P. erosus*, *P. tuberosus* y *P. ahipa*. La especie en estudio (*P. tuberosus*) es originaria de Sudamérica siendo su hábitat natural la zona baja tropical o bosque premontano (Duke, 1981; Sørensen, 1988, 1990).

A las jícamas se las considera como un cultivo promisorio debido a su alto potencial de producción de materia orgánica para uso humano y animal, ya que algunas especies poseen rendimientos excepcionales de 150 t/ha y contenidos de 3 a 5 veces más proteínas que otras raíces como yuca (*Manihot esculenta* Crantz) o camote (*Ipomoea batata*) (Sørensen, 1996). Las raíces tuberíferas dependiendo del cultivar pueden ser consumidas frescas (crudas), preparadas como jugo o cocidas como una interesante sustituto de la yuca (Peckolt, 1922).

Al ser una leguminosa fijadora de nitrógeno y poseer altos contenidos del insecticida natural “rotenona” en las semillas (Sørensen, 1996), es una opción interesante para ser usada en agricultura orgánica y sistemas de producción principalmente como cultivo de cobertura, para mejorar las condiciones del suelo y controlar malas hierbas. La extracción de la rotenona podría convertirse en un subproducto del cultivo, pues se ha demostrado su capacidad para el combate de trips, áfidos y larvas de mosca blanca (Sørensen, 1988), lo que podría ser usado en el manejo integrado de plagas.

El CATIE inició en 1985 una colección que actualmente incluye 180 entradas de *Pachyrhizus* spp., creada bajo el marco del “Yam Bean Project” y constituida por materiales provenientes principalmente de Meso y Sudamérica.

La caracterización de la variabilidad genética de los estos recursos fitogenéticos constituye un factor de peso decisivo en la solución de los problemas actuales y futuros relacionados con la productividad del cultivo, la adaptación a los cambios climáticos y el desarrollo de nuevas alternativas en la obtención de variedades mediante la utilización de métodos tradicionales o biotecnológicos (IPGRI, 1995; Karp *et al*, 1997).

Márquez (1992), evaluó 40 entradas de *P. erosus* de esta colección y definió un grupo de parámetros a ser tomados en cuenta en futuras evaluaciones. Los genotipos correspondientes a *P. tuberosus* aún no han sido evaluados, lo cual sería de importancia no sólo para avanzar en la evaluación de la colección, sino, porque esta especie se considera como la que tiene mayor potencial dentro del género después de *P. erosus*.

La caracterización de este grupo de genotipos, permitirá ampliar los conocimientos de la variabilidad genética del género, facilitando así la identificación de materiales con características deseables como son alta producción, alto contenido de rotenonas y de proteínas, además de otras características taxonómicas de utilidad como por ejemplo, el hábito de crecimiento y vigor de la planta, útiles para los programas de mejoramiento.

La caracterización de germoplasma es el paso inicial para la utilización de especies que, como la jícama, no han contado con programas amplios de mejoramiento. Aquí los bancos de germoplasma tienen que jugar un rol fundamental, protagónico y estratégico, proveyendo de materiales elite que permitan incrementar las opciones agrícolas en los trópicos, para crear nuevas fuentes de alimentos y subproductos.

En este estudio se caracterizaron morfológicamente y molecularmente 31 entradas de *P. tuberosus* pertenecientes a la colección del CATIE. Se estableció los parámetros más importantes para esta y para futuras caracterizaciones, así como el número de muestra adecuado para la evaluación del germoplasma. Además, se estableció relaciones entre la caracterización morfológica y la molecular de los materiales, para determinar el grado de complementariedad de ambos métodos.

## 1.2. Objetivos del estudio

### General

Evaluar la variabilidad genética de la colección de germoplasma de jícama (*P. tuberosus*) del CATIE mediante la caracterización morfológica y molecular de sus genotipos.

### Específicos

- Caracterizar morfológicamente las 31 entradas de *P. tuberosus* de la colección de jícama del banco de germoplasma del CATIE.
- Caracterizar molecularmente mediante la técnica RAPD (ADN polimórfico amplificado al azar) la misma colección.

- Estimar el tamaño de muestra óptimo para los diferentes descriptores morfológicos utilizados
- Determinar mediante análisis multivariado los diferentes agrupamientos dentro de la colección de *P. tuberosus*.
- Identificar los caracteres cuantitativos y cualitativos más confiables y de alto valor discriminante que permitan reconocer relaciones genéticas entre grupos y entradas de jícama
- Establecer estimaciones de variabilidad genética mediante un diseño estadístico en la colección de *P. tuberosus*
- Comparar la diversidad genética detectada por los caracteres morfológicos y los marcadores moleculares del ADN.

## 2. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1. Botánica

Desde el punto de vista botánico Sørensen (1990) y León (1987) mencionan que la planta de *P. tuberosus* es una enredadera herbácea de reproducción sexual autógena con un 2 a 4% de polinización cruzada. Es la más grande del género, pues alcanza longitudes superiores a los 10 m. Posee follaje más abundante y oscuro que *P. erosus* y tallos muy ramificados.

Las hojas son compuestas (trifoliadas), grandes, enteras y en ocasiones levemente dentadas (Clausen, 1945). Pecíolo de 40-208 mm de largo, pulvínulos pubescentes y estípulas lineares-lanceoladas (Sørensen *et al*, 1997). Las inflorescencias (por lo general una por axila), tienen el pedúnculo grueso y cilíndrico, de 10 a 25 cm de longitud y no difieren en forma y color de las de *P. erosus*. Poseen de 7-33 flores por eje lateral. Los pétalos son usualmente pubescentes, aunque se han observado especímenes glabros. El color de la flor es blanco o violeta azulado claro u oscuro.

Las vainas son las más largas del género, de 13-19 cm de largo y de 14-23 mm de ancho. Poseen pelos rojizos irritantes (Duke, 1981). Las semillas son reniformes, casi redondas, pero más grandes que en *P. erosus*. Miden de 10 a 15 mm de largo y poseen una testa color anaranjado-rojizo, negro, o moteado negro con blanco.

Las raíces tuberosas pueden presentar mono o multitubérculos, grandes con forma de trompo o irregulares, hasta de 30 cm de largo y 25 de ancho, suculentas y blancas, a veces con fibras.

## 2.2. Recursos Genéticos

### 2.2.1. Variabilidad genética de *P. tuberosus*

*P. tuberosus* es muy poco conocida a nivel urbano y de ciertas áreas rurales tanto taxonómica como agronómicamente porque es cultivada en sitios alejados y en pequeñas extensiones situadas principalmente en tierras bajas de la Amazonia. Hasta la actualidad todavía no se conoce en su totalidad la diversidad genética de esta especie (Sørensen *et al*, 1996).

A pesar de esto, su similitud con *P. erosus*, que es la especie de jícama más conocida y utilizada, y algunas experiencias recientes, hacen prever que esta especie dispone de una amplia variabilidad genética y potencial de mejoramiento a partir de material silvestre o de los genotipos cultivados que ya están en uso (Sørensen, 1996).

Sørensen (1996) examinó los especímenes de herbario de *P. tuberosus* disponibles a nivel mundial para una revisión taxonómica, y encontró variación morfológica en un número considerable de cultivares locales. Encontró que el rango natural de adaptación de la especie es amplio, pues algunos de los genotipos provienen de sitios como la Amazonia (denominadas según su origen, chuines y ashipas) con condiciones medioambientales de alta humedad relativa y precipitación, mientras que otros provienen de las tierras bajas secas de la costa del Ecuador (jíquimas).

Los cultivares fueron divididos por Sørensen (1996) en dos grupos distintos basados en la longitud internodal y en la morfología de la hoja: 1) cultivares con entrenudos largos, hojas enteras y racimos largos (360 mm), como los genotipos de la Amazonia y el Caribe, y 2) cultivares con entrenudos cortos, hojas profundamente lobuladas y racimos interrumpidos por las hojas, como son los genotipos de la costa oeste del Ecuador. Ambos grupos están representados en la colección de jícama del CATIE.

De acuerdo con Sørensen (1996), últimamente ha sido posible distinguir tres grupos representativos de *P. tuberosus*:

a) Jíquimas: este grupo de cultivares tradicionales, localmente conocidos como jíquimas, han sido escrupulosamente colectados. Genotipos con alta diversidad genética pueden ser encontrados en cultivo, principalmente en el oeste de Ecuador, en la zona costanera de clima seco de la provincia de Manabí, y también ocasionalmente en la provincia de Los Ríos en donde existen materiales silvestres diferentes a los cultivados principalmente en su hábito de crecimiento. Se ha observado en los materiales cultivados, variaciones o diferencias en los bordes de las hojas y en el color de la flor principalmente; el material de Manabí tiene flores blancas, y el de Los Ríos blancas y violetas. El hábito de crecimiento y la forma y calidad de la raíz tuberífera no varían; las raíces tuberosas en promedio pesan de dos a tres kg. La pulpa blanco cremosa es muy succulenta, crujiente y sabrosa. A diferencia del grupo de ashipas, la jíquima es arbustiva y con un ciclo vegetativo más corto (cinco meses), lo cual significa un gran potencial para cultivarla comercialmente.

b) Ashipas: El prototipo de planta en este grupo es el encontrado en la Amazonia de Colombia, Brasil, Venezuela, Ecuador y Bolivia; siendo la planta una liana trepadora. Las ashipas pueden ser divididas en dos grupos:

- 1) Las multiraíces (con dos subgrupos, ashipa I y ashipa II)
- 2) Las monoraíces (contienen un subgrupo solamente, ashipa III)

Ashipa I y ashipa II producen varias raíces grandes oblongas por planta, con las raíces extendidas hacia afuera lateralmente. La diferencia entre ashipa I y ashipa II es el color y el sabor de la raíz fresca: ashipa I tiene pulpa blanca con pequeñas y poco dulces raíces, mientras que, ashipa II tiene color de pulpa amarillo con mayor contenido de azúcares. El tercer cultivar, ashipa III produce una gran raíz vertical en forma de nabo con pulpa blanca y pocos

azúcares. Todas tienen semillas en forma de riñón de un color naranja-rojizo/marrón-rojizo a negro ligero. En estos grupos, las flores son blancas o violetas.

Los cultivares brasileños descritos por numerosos autores (Peckolt, 1880; Arruda, 1921; Peckolt, 1922; Hoehne, 1938; Lepage *et al*, 1946; Menezes y Oliveira Nunes, 1955) son separados en dos grupos:

- 1) Con flores violetas rojizas, semillas negras, monoraíz con piel grisácea y con una capa subcutánea rojo violeta
- 2) Con flores blanco cremas, semilla roja, multiraíz.

c) Chuines: La amplia variabilidad de este grupo se refleja en la forma y calidad de la raíz, de los genotipos encontrados a lo largo de la parte central del Río Ucayali en la Amazonia peruana, la cual posee un clima permanentemente húmedo. Varios grupos de cultivares aislados han sido identificados en Ecuador, Perú y Bolivia y de acuerdo con la información disponible de los especímenes de herbario, existen varias poblaciones adicionales que podrían tener características de interés en Colombia, Venezuela y Paraguay.

Al igual que las ashipas, los chuines pueden ser subdivididos de acuerdo a la piel y color de la piel de las raíces y al color de la pulpa:

- 1) Chuin I, localmente conocido como chuin blanco, tiene piel y pulpa blanca.
- 2) Chuin II, conocido como chuin amarillo, tiene pulpa y piel amarilla
- 3) Chuin III, conocido como chuin morado, tiene piel de púrpura a violeta oscuro y pulpa blanca (Sørensen, 1996).

Los chuines difieren de la mayoría de las ashipas en los siguientes aspectos: 1) es una monoraíz uniforme; 2) produce raíces verticalmente; 3) tiene alto contenido de materia seca, la cual es comparable a las raíces de yuca; 4) las hojas laterales son completamente diferentes en

largo y ancho con los grupos de ashipa y jíquima, y 5) la morfología de las legumbres y semillas (Sørensen, 1996).

En el Cuadro 1 se resume la distribución geográfica y las características morfológicas más relevantes en que se diferencian según Sørensen (1996). los tres tipos de *P. tuberosus*.

**Cuadro 1.** Distribución geográfica y características morfológicas relevantes de los chuines, ashipas y jíquimas. CATIE, 1998.

CARACTER	JIQUIMAS	ASHIPAS	CHUINES
Distribución	Costa oeste de Ecuador	Amazonia de Colombia, Ecuador, Brasil, Venezuela y Bolivia	Amazonia de Perú
Tipo de foliolo	Trilobados profundos	Enteros	Trilobados superficial.
Hábito de crecimiento	Arbustivo	Semitrepador y trepador	Trepador
Raíz	Monoraíz	Mono y multiraíz	Monoraíz
Color pulpa	Blanca cremosa	Monoraíz: blanca Multiraíces: blanca y amarilla	Blanca, amarilla, púrpura y violeta oscura
Curvatura de vaina	Curvada	Recta	Recta
Porcentaje de materia seca	Bajo	Intermedio	Alto

### 2.2.2. Caracterización de los genotipos

La caracterización de la variabilidad genética de los recursos fitogenéticos está considerada entre las líneas de investigación estratégicas a nivel mundial debido a que es un factor de peso decisivo en la solución de los problemas actuales y futuros relacionados con la

productividad de los cultivos comerciales, la adaptación a los cambios climáticos y el desarrollo de nuevas alternativas en la obtención de variedades mediante la utilización de métodos tradicionales o biotecnológicos (IPGRI, 1995; Karp *et al*, 1997).

La caracterización de las colecciones de germoplasma es un paso fundamental dentro del manejo de las colecciones porque permite conocer el germoplasma, depurar u organizar los materiales, y sobre todo identificar genotipos valiosos para ser usados directamente o en los programas de mejoramiento genético. Por lo tanto, un buen sistema de conservación y de caracterización en los Programas de Recursos Fitogenéticos es vital para tener información disponible de cada entrada sobre caracteres cualitativos y cuantitativos de importancia económica actual o futura.

El análisis de la diversidad genética y la relación entre y dentro de diferentes especies, poblaciones e individuos es una tarea central para muchas disciplinas de la ciencia biológica (Weising *et al*, 1995). Tradicionalmente las evaluaciones de los genotipos contenidos en las colecciones han sido realizadas mediante el uso de descriptores morfológicos y agronómicos pero en la actualidad mediante técnicas moleculares (RAPDs, RFLP, etc.) es posible también evaluar directamente el contenido de ADN, información que puede ser usada en forma complementaria a la caracterización fenotípica, para organizar en forma más depurada y eficiente las colecciones de germoplasma.

Esta información es valiosa para los fitomejoradores que siempre han tratado de seleccionar individuos que posean más de una característica deseable. Así por ejemplo, se ha dado prioridad a aquellos genotipos que muestran en forma simultánea, resistencia a una enfermedad y alta producción. Este tipo de selección ha sido exitosa para la mayoría de los cultivos alimenticios del mundo, debido en gran medida a su corto ciclo de vida. Sin embargo, y a pesar de los importantes y a veces dramáticos avances alcanzados en la producción de cultivos como arroz, maíz y trigo, es bien conocido que aún en esas especies, el potencial genético permanece virtualmente inexplorado. Esto se debe a que las colecciones de germoplasma para la mayoría de cultivos, contienen miles de introducciones que nunca han

sido caracterizadas ni evaluadas. Con el desarrollo de descriptores y marcadores de ADN, ha sido posible iniciar el estudio de las colecciones en una forma más eficiente, sistemática y rápida, planteándose objetivos fácilmente alcanzables desde el punto de vista del mejoramiento genético de las plantas (Phillips *et al*, 1995).

Según Taba (1991), la caracterización y evaluación sistemática debe comprender las siguientes fases:

1. Caracterización de las entradas
2. Agrupamiento de las entradas según métodos estadísticos multivariados
3. Evaluación en múltiples localidades
4. Formación de los subconjuntos centrales
5. Desarrollo de una base de datos
6. Evaluación final

#### **2.2.2.1 Caracterización morfológica**

Los caracteres morfológicos han sido muy usados para la identificación de especies, familias y géneros de plantas. Además, las características morfológicas y su etnobotánica han sido el tema de números estudios en genética de poblaciones y agricultura, donde la resistencia a plagas y enfermedades y el rendimiento han sido factores importantes (Falconer, 1981). Este tipo de caracteres son usualmente dominantes o recesivos (Lefebvre y Chèvre, 1995). Niveles de variabilidad pueden ser estimados usando caracteres morfológicos, su respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos pueden ser determinados; además, las correlaciones genéticas y las fuerzas de selección pueden ser inferidas (Wolff, 1988).

Es así que la mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica tiene sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Para llegar a estos protocolos se han realizado estudios básicos de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas; luego se han seleccionado aquellas características

cualitativas o cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (Enríquez, 1966).

En la mayoría de las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; entre estos órganos quizá los más importantes son la flor y el fruto; le siguen en importancia otros como las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enríquez, 1991).

Dentro de los caracteres morfológicos que definen las características del género *Pachyrhizus* está el hábito de crecimiento (rastrero o trepador). Las alas y quillas cileadas o glabras fue el carácter usado por Clausen (1945) para delimitar *P. erosus* (especie glabra) de otras especies. El contorno de los folíolos terminales de la hoja es extremadamente variable, abarcando el tipo entero, dentado, lobulado, palmado o linear y la longitud de la flor es solamente útil en la separación de *P. erosus* de *P. ferrugineus*. Para distinguir especies, la relación diámetro/longitud de la vaina es importante ya que presentan mucha variación (Sørensen, 1988).

Las primeras colecciones de *P. tuberosus* en campo fueron establecidas en 1985. En ese momento solamente tres entradas estaban disponibles para los análisis taxonómicos y las evaluaciones agronómicas. Estas tres entradas poseían unas pocas características morfológicas que eran distintivas, por ejemplo, color de la flor, tamaño de inflorescencias y legumbres, y color de la semilla, pero las raíces tuberosas eran de similar calidad con un contenido de materia seca relativamente bajo. Diez años después, los esfuerzos por incrementar la información disponible sobre la diversidad de esta especie, han revelado que *P. tuberosus* posee una asombrosa variabilidad para casi todas las características de importancia agronómica, por ejemplo, forma de la raíz y calidad, multi o mono/raíz, hábito de crecimiento determinado o indeterminado, resistencia a la sequía, resistencia o tolerancia a plagas y enfermedades (Sørensen, 1996).

Las diferencias morfológicas entre los tres grupos mencionados en el acápite 2.2.1 están basadas principalmente en que los chuines y jíquimas presentan una monoraíz vertical invariable en comparación con los ashipas que poseen raíces laterales. Además, los chuines tienen un alto contenido de materia seca, la cual es comparable a las raíces de yuca y las hojas laterales son lobulo-lanceoladas en relación a los grupos de ashipa y jíquima que tienen bajos contenidos y hojas enteras acorazonadas (Sørensen, 1996).

Márquez (1992) realizó una caracterización morfológica de la colección de *P. erosus* del CATIE, para lo que utilizó principalmente los siguientes caracteres cuantitativos: período de floración, número de botones florales, número de ramas por planta, número de ramas con inflorescencias, número de inflorescencias por rama y el número de hojas por planta. Los caracteres cualitativos fueron: hábito de floración, porcentaje de raíces medianas y pequeñas, dureza de la pulpa, color del estandarte de la flor, hábito de crecimiento, tamaño y color de la semilla, forma de la raíz entre los principales. En esa investigación se pudo observar que los caracteres de la flor y del crecimiento vegetativo son importantes en la clasificación de la especie.

En la investigación de Márquez (1992) se identificó tres grupos jerárquicos. El primer grupo se caracterizó por contener entradas con la menor variabilidad genética, provenientes de una área común (México) y manifestaciones evidentes de su uso en la región de Celaya y Guanajuato en cultivos intensivos. El segundo grupo, de mayor diversidad geográfica, estuvo conformado principalmente por materiales de Guatemala, México y El Salvador, cuyas similitudes observadas manifestaron un posible ancestro común, producto de introducciones, confirmando las investigaciones de Sørensen (1990) sobre la gran distribución natural de la especie, fuera del área Neotropical. El tercer grupo se conformó por las entradas silvestres y fue el de mayor variabilidad genética en caracteres de la flor, raíz tuberosa y crecimiento vegetativo.

En el mismo estudio se observó que los caracteres de crecimiento vegetativo (número de nudos del tallo principal, longitud del tallo, número de hojas y velocidad de crecimiento) tuvieron una asociación muy estrecha con los caracteres de la flor (inflorescencias/rama, inflorescencia y largo de la inflorescencia) indicando que bajo las condiciones particulares de Turrialba, los genes que estimularon dicho crecimiento también lo hicieron sobre la floración y, consecuentemente, sobre la producción de semilla (Márquez, 1992).

Observaciones de campo realizadas por Sørensen *et al* (1997) en Bolivia, Ecuador y Perú de *P. tuberosus* fueron analizadas por el sistema multivariado con 23 caracteres morfológicos de 31 entradas. El resultado del análisis de componentes principales en una ordenación tridimensional indicó que los tres ejes representaban el 61.8% del total de la variación. Los caracteres que contribuyeron en mayor grado fueron: los pétalos para el primer componente, peciolo y peciolulo para el segundo y relación largo/ancho de las hojas laterales y terminal para el tercer componente.

En la misma investigación se informa que de acuerdo al análisis estadístico realizado de 23 caracteres morfológicos, existe tres grupos morfológicos bien definidos denominados jíquimas, chuines y ashipas notándose que los materiales más distintos eran las jíquimas (Sørensen *et al* 1997). Esta investigación sirvió de apoyo para la clasificación comúnmente aceptada de los tipos de *P. tuberosus*, la cual ya fue mencionada en el acápite 2.2.1.

## **2.2.2.2 Caracterización molecular**

### **2.2.2.2.1 Marcadores moleculares**

Existen dos grupos de marcadores moleculares: los que analizan las proteínas y los que analizan directamente los ácidos nucleicos (ADN, ARN). Para el análisis del ADN, actualmente están disponibles un número creciente de técnicas moleculares. Se incluye entre otras, los RFLP (Fragmentos de Restricción de ADN de Longitud Polimórfica) y los

marcadores basados en la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), o sea, los RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar), los microsátélites, minisátélites y más recientemente los AFLP (Fragmentos Amplificados de ADN de Longitud Polimórfica). Estos segmentos usualmente representan variantes o sitios polimórficos que pueden ser identificados empleando estrategias generales tales como hibridación molecular o amplificación enzimática del ADN (Caetano-Anollis, 1993).

La aplicación más inmediata de los marcadores moleculares es la identificación de entradas y la caracterización genotípica de colecciones (Breure, 1996), además se utilizan para la estimación de los niveles de variación de las colecciones de germoplasma, para estudios filogenéticos, para el monitoreo de la pureza de semillas híbridas, selección de características agronómicas de importancia, para la creación de mapas de ligamiento, entre otras.

Es así que la caracterización molecular usando marcadores moleculares tiene varias ventajas tales como: 1) no es influenciada por el medioambiente; 2) puede ser usada cualquier parte de la planta en cualquier estado de crecimiento; 3) el número de análisis es ilimitado; 4) se requiere pequeñas cantidades de material vegetal; 5) ADN es altamente estable; 6) alto polimorfismo (número de alelos/locus); y, 7) distribuidos por todo el genoma (León, 1998; Powell, 1992; Rao y Riley, 1994; Tanksley, 1993).

Un estudio de la diversidad genética molecular en las colecciones de germoplasma de *Pachyrhizus* permitirá según Sørensen (1996) lo siguiente:

- Estimación de los niveles y distribución de la diversidad genética dentro y entre especies
- Localización de centros de origen de la diversidad genética para colecciones y conservación.

- Análisis y relaciones filogenéticas dentro del género *Pachyrhizus* con particular énfasis sobre el origen de las especies cultivadas *P. ahipa*, *P. erosus* y *P. tuberosus*.
- Caracterización molecular en especímenes que tengan rasgos genéticos asociados con constituyentes de valor, por ejemplo, producción de rotenonas.

#### 2.2.2.2. Análisis PCR/RAPD

El PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) es una técnica versátil que fue inventada a mediados de los años 80 (Saiki *et al*, 1988). Consiste en la síntesis enzimática de secuencias específicas de ADN, para lo cual utiliza dos “primers” que hibridan cadenas opuestas a ambos lados del ADN que se está analizando (Ehrlich, 1989). Desde la introducción de la enzima termoestable polimerasa en 1988, el uso del PCR en investigación se ha incrementado significativamente (Saiki *et al*, 1985).

Una técnica derivada de PCR que en los últimos años ha sido muy usada es los RAPDs (ADN Polimórfico Amplificado al Azar) (Williams *et al*, 1990; Welsh y McClelland, 1990; Welsh *et al.*, 1991); los cuales fueron inventados por Williams *et al* (1990). Los RAPDs son copias de fragmentos de ADN producidas al azar y se basa en la probabilidad de que una secuencia dada de ADN se encuentre en el genoma en cadenas opuestas del mismo y en orientación opuesta dentro de una distancia tal que sea posible su amplificación (Phillips *et al*, 1995).

Los polimorfismos producidos con esta técnica se denominan marcadores RAPD. Pueden resultar de cualquier cambio en la secuencia o sitio de unión del “primer” (oligonucleótido, o sea, un segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado (Ehrlich, 1989); lo cual impide que el “primer” se una a la cadena, o también puede ser el producto de cambios que alteren el tamaño o impidan la exitosa amplificación del ADN molde (Waugh y Powell, 1992).

El método en esencia implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del “primer” a la cadena desnaturalizada y la síntesis a partir del “primer”, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa.

Las ventajas de esta técnica es que genera un número inmenso de marcadores, es efectiva con pequeñas cantidades de ADN y la tecnología es relativamente simple y barata, permitiendo el análisis de un gran número de muestras en un corto tiempo (Williams *et al*, 1993).

El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos para llevarse a cabo (Phillips *et al*, 1995):

i) ADN molde: el método de extracción del ADN no es particularmente importante, aunque la vida del ADN depende de la técnica de extracción y de las condiciones de almacenamiento (Sambrook *et al*, 1989; Weising *et al*, 1995). Las técnicas basadas en PCR no requieren preparaciones puras de ADN (Edwards *et al*, 1991), es así que métodos de extracción simples y rápidos pueden ser empleados. Por otro lado, cantidades entre 5 y 500 ng usualmente proveen buenos resultados (Lowe *et al*, 1996). Los patrones de RAPD parecen ser afectados por muy bajas concentraciones de ADN (Williams *et al*, 1993; Weising *et al*, 1995) pero también las altas concentraciones de ADN pueden afectar la repetitividad de bandas (Munthali *et al*, 1992). Concentraciones de 10-50 ng/50 ml (volumen de reacción) ha sido encontrado como óptimo (Weising *et al*, 1995). En Escocia en trabajos con *P. tuberosus* se utiliza 2,5 µl (12,5 ng / 25µl) de ADN (Estrella, comunicación personal).

ii) “Primer” o iniciador: Varias compañías comerciales los producen (ejemplo: Operon Technologies, Inc. And Pharmacia LKB). La concentración de los “primers” óptima es normalmente de 0.1 a 2.0 mM (Williams *et al*, 1993), y fuera de estos límites usualmente los resultados carecen de amplificación. Los “primers” normalmente están conformados de una cadena de 10 nucleótidos, conteniendo más de un 50% de las bases GC para su buen

funcionamiento (Weising *et al*, 1995). “Primers” de Operon de los sets A (A2, A13), B (B7, B8) o H (H2, H3, H5, H14) funcionan bien en *Pachyrhizus* spp. produciendo un buen número de polimorfismos (Estrella, comunicación personal).

iii) Desoxinucleótidos: se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena siendo para Estrella (comunicación personal) lo óptimo para la especie en estudio 1,25  $\mu$ l a una concentración de 100  $\mu$ M.

iv) Solución bufer: las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibradas generalmente a un pH de 8,3. Muchos estudios han demostrado una marcada influencia de la concentración de Magnesio sobre la obtención de los patrones de RAPDs. Bandas fuertes son obtenidas con un amplio rango de concentraciones de Magnesio; es decir un cambio en la concentración resulta en cambios cualitativos de los patrones de bandas (Williams *et al*, 1993; Wolff *et al*, 1993). Weising *et al*, (1995) sugieren que el rango de concentración de Mg debe ir desde 1,5 a 10  $\mu$ M, siendo 2  $\mu$ M una concentración adecuada de inicio de la investigación.

v) Taq-polimerasa: es una enzima ADN-polimerasa termoestable extraída de la bacteria *Thermus aquaticus* (Erich, 1989). Esta enzima tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN mediante su síntesis a partir de un punto determinado fijado en este caso por el “primer”.

Una gran variedad de patrones de bandas de RAPD pueden ser observados dependiendo de la fuente de Taq polimerasa usada (Williams *et al*, 1993). En particular, polimerasas truncadas como la Stoffel Fragment (Perkin Elmer) pueden radicalmente dar diferencias en los perfiles de bandas RAPD comparados con polimerasas que poseen actividad exonucleasa de 5' a 3', por ejemplo, Taq polimerasa, Promega and AmpliTaq (Perkin Elmer) (Weising *et al*, 1995). Por lo tanto, el uso de las mismas marcas de Taq polimerasa para experimentos repetidos es esencial, así como la pureza de la Taq polimerasa. Las enzimas deben estar libres de cualquier contaminante bacteriano de ADN. Esto generalmente no es un problema con

enzimas comerciales, sin embargo, esto es importante si se prepara en el mismo laboratorio la polimerasa (Lowe *et al*, 1996).

Phillips *et al* (1995) informan que la eficiencia de la técnica RAPD depende de cuatro factores:

- a) Número de ciclos de amplificación: al respecto se debe tener en cuenta que en los primeros ciclos el producto se incrementa más rápidamente que en los ciclos finales.
- b) Cantidad de ADN inicial: las muestras con concentraciones relativamente altas de ADN producen rendimientos más bajos de amplificación que las reacciones en que se usan bajas concentraciones
- c) Longitud del ADN: la eficiencia es inversamente proporcional a la longitud del ADN.
- d) Temperatura: el proceso está regulado por este factor.

La técnica RAPD es una excelente herramienta para la caracterización de la colección de *P. tuberosus* (valoración de la variación genética), pero es importante que los protocolos usados sean exactamente descritos con la finalidad que puedan ser estandarizados. Solamente sobre esta base se podrán realizar varios tipos de estudios importantes para los curadores de bancos de germoplasma, como son: 1) síntesis de los resultados obtenidos por diferentes laboratorios con diferentes colecciones de la misma especie, las cuales pueden o no tener duplicados del material; 2) comparación de los resultados obtenidos sobre la misma colección en diferentes épocas, por ejemplo después de un número de ciclos de regeneración y; 3) estimación de la diversidad genética representada por cualquier nueva adición de una colección ya valorada (Lowe *et al*, 1996).

La investigación molecular en proceso involucra cruzamientos y estudio de la estabilidad de varios caracteres genéticos, utilizando Polymerase Chain Reaction (PCR)/

RAPDs que pueden ayudar a resolver el nivel de distribución de la diversidad genética dentro y entre especies de *Pachyrhizus* (Sørensen, 1996).

En la Universidad de Sant-Andrews, Escocia, se está estudiando la diversidad genética y las relaciones interespecíficas de *Pachyrhizus* usando RAPD. Los polimorfismos obtenidos en este estudio demostraron que estos marcadores moleculares son útiles para discriminar entre las entradas de *P. erosus* y *P. tuberosus*. El constante agrupamiento de los materiales mexicanos de *P. erosus* en cultivo en un subgrupo independiente, refuerza la hipótesis de que la distribución de esta especie en México es el resultado de una limitada introducción de germoplasma a la región (Estrella *et al*, 1996).

### **2.2.2.3. Relación entre la caracterización morfológica y molecular**

La diversidad genética de un cultivo se puede estudiar por medio de las más avanzadas técnicas moleculares y también por los rasgos morfológicos. La diversidad molecular no considera las interacciones genotipo por medio ambiente; por lo tanto, estas dos técnicas se complementan una con otra (Taba, 1991).

Los descriptores cuantitativos son dependientes del genotipo y el medio ambiente e incluyen caracteres morfológicos y agronómicos útiles, como por ejemplo, precocidad o resistencia a sequía. No todos ellos son convenientes para el estudio de la biodiversidad (Hamon *et al*, 1995). El inconveniente aquí es que solo se analiza la fracción del ADN que además de ser codificante, se expresa y puede ser determinado.

Un punto de discusión importante, es el grado de concordancia entre los marcadores moleculares y los rasgos morfo-agronómicos. Aunque la zona ecológica es útil en el establecimiento de colecciones núcleo, no hay siempre una clara correlación entre la distancia geográfica y la distancia genética (Lefort-Busson y De Vienne, 1985). Hillis (1987) proporciona un argumento útil expresando que los trabajos morfológicos en grandes

colecciones, los moleculares en pequeñas muestras y estudios que combinan aquellos maximizan la información y su utilidad.

Dos métodos han sido desarrollados para solucionar conflictos: técnicas de consenso y combinación de técnicas. Las técnicas de consenso enfatizan la estabilidad e información en común, mientras que la combinación de técnicas enfatiza sobre el poder descriptivo y parsimonia global (Miyamoto, 1985).

Varios métodos de construcción de cladogramas de consenso han sido desarrollados (Adams, 1972; Margush y McMorris, 1981; Nelson, 1979; Nelson y Platnick, 1981; Penny *et al*, 1982). Los métodos más comúnmente usados son: Adams consenso (Adams, 1972), consenso estricto (Nelson, 1979) y consenso mayoritario (Margush y McMorris, 1981). En el árbol de consenso de Adams, los conflictos cubiertos son colapsados para el primer nudo; en cambio, el árbol de conflicto estricto consiste de grupos de especies que son definidas para cada set de datos y representa el más conservativo método de reconciliación de conflictos. El método de consenso mayoritario es similar al estricto pero identifica grupos monofilogénicos reconocidos en su gran mayoría por la hipótesis establecida de la relaciones entre los set de datos.

Aplicando las técnicas antes mencionadas se realizó una investigación con especies de ranas del género *Rana* y se trabajó con tres tipos de set de datos: dos moleculares (rDNA y aloenzimas) y uno morfológico. Los set de datos no mostraron conflictos y al realizar el análisis por separado, las aloenzimas generaron información entre las relaciones entre especies, mientras que los morfológicos y rDNA lo hicieron a un nivel más bajo dentro del análisis (dentro de especies). Al combinar todos los grupos de datos, se logró obtener una completa resolución del árbol (Case, 1978; Chantell, 1970; Farris *et al*, 1980; Green, 1986; Hillis, 1985; Hillis y Davis, 1986).

Estudios que combinen las dos técnicas (morfológicas y moleculares) pueden maximizar el contenido de la información y su utilidad. Sin embargo, es importante seleccionar métodos

que puedan asumir libremente como sea posible y también que sean adecuados para la combinación de los sets. Esto requiere de métodos de coeficientes independientes “rate-independent” de construcción de redes y árboles arraigados “tree rooting”, también como el uso de datos de estados de caracteres. Tales combinaciones de estudios moleculares y morfológicos podrían proveer de un amplio y verdadero conocimiento de la diversidad de las especies (Hillis, 1987).

En la década de los 80 y 90 se han realizado algunas investigaciones tendientes a relacionar estadísticamente los caracteres morfológicos y los moleculares, es así, que Autrique *et al* (1996), obtuvo una moderada correlación entre RFLP basados en distancias genéticas y distancias basadas en 16 caracteres morfológicos y agronómicos en trigo duro. Al igual, Beer *et al* (1993) y Schut *et al* (1997) trabajaron en avena y cebada respectivamente, encontrando relaciones de bajas a moderadas entre los marcadores moleculares (RFLP y AFLP) y los caracteres morfológicos.

La manera de comparar las matrices de datos es calculando para los caracteres moleculares, las distancias genéticas o coeficientes de similaridad por cualquier algoritmo, principalmente por Jaccard o Nei. Los datos morfológicos son estandarizados (transformación z) para cada característica y luego una transformación de rangos o un análisis de componentes principales es ejecutado. Una vez, obtenidas las matrices de los dos tipos de caracteres se comparan con el comando MXCOMP del software NTSYS-pc (Rohlf, 1990) o mediante el estadístico Mantel (Mantel, 1967), o también mediante el procedimiento bootstrap (Efron y Tibshirani, 1993). Este tipo de comparación da como resultado la identificación de correlaciones entre los caracteres morfológicos y moleculares.

## **2.3. Análisis Estadístico**

### **2.3.1. Tamaño de muestra**

Luego de definir los mejores caracteres para evaluar los genotipos, el siguiente paso es el de estimar el tamaño óptimo de la muestra, es decir, el número de observaciones que se deben hacer dentro de una planta o de plantas del mismo cultivar para que el parámetro represente la muestra del cultivar estudiado (Enríquez, 1966; Pound, 1932).

Con la finalidad de obtener estos datos, el técnico debe hacer estudios previos en los que se represente la mayor variabilidad posible de la especie; de esta manera se puede garantizar que la muestra no cambie sensiblemente de población a población (Enríquez, 1991).

Si el estudio se basa en una población homogénea, se corre el riesgo de una subestimación del tamaño de la muestra, por eso es que hay que garantizar la mayor variabilidad posible (Enríquez, 1991).

### **2.3.2 Taxonomía numérica**

Según Sneath y Sokal (1973), la taxonomía numérica consiste en el agrupamiento de unidades taxonómicas por métodos numéricos sobre la base del estado de sus características. La posición fundamental de la taxonomía numérica indica que entre mayor es el contenido de la información en la taxa de una clasificación y entre más sean los caracteres sobre los cuales esté basada, mejor será la clasificación. Cada carácter es de igual peso en la creación de una taxa natural. La similitud general entre dos entidades es función de sus similitudes individuales en cada uno de los caracteres para los cuales son comparados. Las distintas taxas podrán ser reconocidas debido a que las correlaciones de caracteres difieren en los grupos de organismos bajo estudio. A partir de la estructura taxonómica y de las correlaciones entre caracteres de un grupo, se pueden hacer inferencias filogenéticas, dando ciertos supuestos acerca de rutas y mecanismos de evolución y finalmente, las clasificaciones se apoyan en la

similitud basada sobre un grupo de caracteres fenotípicos de los organismos bajo estudio dependiendo esta de la clase de caracteres y el coeficiente de similitud empleado.

Dentro de la taxonomía numérica de caracteres, la técnica de conglomerados ha sido empleada como un instrumento efectivo en la búsqueda científica de varias áreas del conocimiento. La utilización de algoritmos en el proceso de agrupamiento permite obtener tipos de agrupamientos más consistentes que procedimientos visuales convencionales. Según Anderberg (1973), el análisis por conglomerados puede ser usado para revelar la estructura y relaciones de los datos, además de que puede contribuir directamente al desarrollo de esquemas válidos de clasificación. El mismo autor agrega que no hay lugar para saber si un agrupamiento es bueno o malo, dado que los grupos no son interesantes en sí mismos, sino que el punto de interés está en las inferencias acerca de la estructura de los datos a través del agrupamiento. La mayoría de los métodos de análisis por conglomerados requiere una medida de similaridad a ser definida para cada par de unidades taxonómicas que serán agrupadas. Es decir, cuando se agrupan unidades de datos, la proximidad de individuos usualmente se expresa como una distancia, mientras que el agrupamiento de variables generalmente incluye una correlación como medida de asociación.

Existen dos grandes tipos de agrupamiento: los jerárquicos y los no jerárquicos (Anderberg, 1973). Los primeros operan sobre la matriz de similaridad construida a partir de las medidas de asociación aplicada a los datos; el resultado final es un árbol o dendograma que identifica relaciones entre las entidades agrupadas. Los no jerárquicos se basan en escoger una partición inicial de las unidades de datos y luego alterar los miembros de cada grupo para obtener una mejor partición. Anderberg (1973) también definió que los métodos jerárquicos, además de ser los únicos que permiten agrupar variables, parecen caer dentro de tres agrupaciones principales: método de ligamiento, método del centroide y método de suma de cuadrados de la varianza del error.

Crici y López (1983) indican que las técnicas numéricas constituyen el lenguaje matemático de la clasificación biológica y al igual que Anderberg (1973), coinciden en que los pasos elementales de un análisis de agrupamiento son:

1. Elección de las unidades taxonómicas operativas (OTU)
2. Elección de los caracteres
3. Construcción de una matriz básica de datos
4. Obtención de un coeficiente de similitud para cada par posible de OTU
5. Construcción de una matriz de similitud
6. Conformación de grupos mediante técnicas de análisis de agrupamiento (estructura taxonómica)
7. Caracterización de los grupos mediante la prueba de homogeneidad de varianza o prueba de F o a través del análisis de frecuencia y sus pruebas estadísticas como Coeficiente de Contingencia, Chi cuadrado, Valor Cramer y el Coeficiente Phi

Peeters y Martinelli (1989) manifiestan que con el incremento de las colecciones de germoplasma, los algoritmos multivariados tales como el análisis de agrupamiento jerárquico y sus variantes en métodos de ligamiento simple, ligamiento completo, método del centroide, así como el método de Ward, parecen particularmente útiles.

El método de Ward fue utilizado por López (1991) y Márquez (1992) para el agrupamiento de 106 clones de *I. batata* y 40 entradas de *P. erosus*, respectivamente, de la colección del CATIE. Según Ward (1963), este método hace posible encontrar en cada estado, aquellos dos grupos cuya unión produzca el mínimo incremento en la suma total de cuadrados del error, dentro de grupos. Adicionalmente, el mínimo incremento en la suma de cuadrados del error, es proporcional al cuadrado de la distancia Euclidiana entre los centroides de los grupos unidos. Wishart (1969) demostró cómo el algoritmo de Ward podía ser ejecutado a través de la introducción de una matriz del cuadrado de las distancias Euclidianas entre centroides de grupos.

### 2.3.3 Valor discriminante de los caracteres

El valor discriminante o índice “D” de un descriptor cuantitativo es el número de diferencias significativas detectadas por la prueba de Duncan, expresadas como una fracción del número total de posibles comparaciones dentro de un grupo de clones. La comparación permite seleccionar los descriptores con mayor valor discriminativo. El valor índice “D” para caracteres cualitativos se basa en el número de pares de taxa que un cierto descriptor puede separar y en la cantidad de información que este descriptor comparte con otros descriptores del mismo estudio. La comparación de valores “D” entre un grupo de descriptores permite seleccionar aquellos con mayor valor discriminante. En general, la magnitud de “D” expresa la mayor o menor relación entre clones de un grupo con relación a un determinado carácter; entre mayor sea la relación de los clones de un grupo, menor será el valor de “D” (Engels, 1983a).

La comparación de los valores “D” entre un conjunto de caracteres permite seleccionar aquellos que tienen el mayor valor discriminante y por ende, los más eficientes para la identificación de clones, variedades, entradas, dentro de poblaciones (Engels, 1983a).

Engels (1983a) agrega que cuando se tienen varios grupos de unidades taxonómicas o entradas, los valores “D”, calculados al comparar las entradas en cada grupo, pueden unirse dando lugar a un nuevo valor, “Dw”, al promediar los valores “D” y ponderarlos por el número de unidades existentes en cada grupo. El carácter con mayor “Dw” se identifica como el más discriminante para la separación de entradas y los “Dw” restantes deberán recalcularse mediante la sustracción de la información que comparten el carácter más discriminante. Para esto es necesario utilizar una matriz de correlaciones entre los caracteres involucrados para conocer el grado de asociación y la información que comparten entre sí. La fórmula indica que  $D'w = Dw(1-r^2)$ , donde el factor  $(1-r^2)$  es el coeficiente de no determinación que expresa la proporción de la varianza de un carácter que no ha sido explicada por otro.

En la taxonomía de plantas es frecuente el uso de caracteres como la forma, el color, textura, dureza, etc. Este tipo de caracteres cualitativos tienen estados que son mutuamente

excluyentes, es decir, expresiones fenotípicas discontinuas de una característica. Las fórmulas de Pankhurst (1978) permiten calcular el valor discriminante de entradas dentro de grupos para los caracteres cualitativos sobre la base del número de entradas que pueden separarse y el número total de pares.

En el estudio de Márquez (1992) sobre caracterización sistemática de 40 entradas de *P. erosus*, se identificó tres agrupamientos jerárquicos obtenidos a través del método de Ward, que resumen el parecido taxonómico entre las entradas evaluadas, cuyas relaciones de disimilitud se establecieron por los caracteres cuantitativos y cualitativos de mayor valor discriminante.

#### **2.3.4. Métodos estadísticos multivariados aplicados en biología molecular**

Según Martínez (1995), los métodos y procedimientos estadísticos disponibles para el análisis de los resultados provenientes de ensayos biotecnológicos se pueden agrupar en las siguientes categorías:

- 1) Aquellos que tienen como propósito evaluar la variabilidad, clasificación, estructura y composición genética de las poblaciones.
- 2) Los desarrollados para la construcción de mapas cromosómicos o genómicos, cuando se utilizan marcadores genéticos moleculares, y
- 3) Los denominados QLT “Quantitative trait loci”, los cuales son loci asociados con caracteres cuantitativos de importancia económica.

Los métodos estadísticos más utilizados formalmente son distancias genéticas, índices de similitud, dendogramas y coordenadas principales (Martínez, 1995).

El índice de similaridad (S) más común es el calculado con base en la proporción de bandas que comparten dos genotipos usando la siguiente fórmula:

$$S = 2 n_{ab} / (n_a + n_b)$$

donde:

$n_{ab}$  = número total de bandas evaluadas

$n_a$  y  $n_b$  = número total de bandas que tienen en común los dos genotipos

S puede tomar valores entre 0 y 1, donde 0 significa “ninguna banda en común” y 1 significa “patrones idénticos” (Nei y Li, 1979; Wetton *et al*, 1987).

Otro coeficiente de similitud muy usado es el coeficiente de Jaccard, en el cual se toma en cuenta solamente los pares positivos en el cálculo, de acuerdo a la siguiente fórmula (Patwary *et al*, 1993):

$$J_{ij} = C_{ij} / (n_i + n_j - C_{ij})$$

donde:

$C_{ij}$  = número de pares positivos entre dos individuos

$n_i$  y  $n_j$  = total de número de bandas en los individuos i y j, respectivamente.

El objetivo de la construcción de un árbol filogenético o dendograma es dar la mejor estimación de la historia evolutiva de un grupo de OTUs (Unidades Taxonómicas Operativas). Usualmente, esas OTUs son entre especies, pero recientemente la misma clase de análisis ha sido también aplicado al análisis entre individuos, cultivares o poblaciones dentro de especies.

Básicamente, los dendogramas pueden ser obtenidos por tres diferentes estrategias (Clegg, 1993; Hillis y Moritz, 1990; Weir, 1990):

La primera estrategia comprende métodos de matriz de distancia o cluster análisis. Las distancias entre OTUs están basadas sobre la total similitud entre pares de OTUs.

La segunda estrategia usa métodos de parsimonia y el objetivo principal es proveer patrones filogenéticos. Aquí, un criterio específico (por ejemplo, la minimización total del largo del árbol) es definido por comparaciones alternativas filogenéticas. Se usa algoritmos específicos para computar los árboles que están en máxima concordancia con este criterio.

La tercera estrategia cuenta con un método de máxima probabilidad usando métodos estadísticos estándares para un modelo probabilístico de evolución. Con este método todos los posibles árboles han de ser evaluados, lo cual significa que todo el conjunto de datos debe ser manejado (Weising *et al*, 1995).

Las coordenadas principales es un conjunto de técnicas estadísticas-matemáticas para encontrar una configuración de puntos a partir de una matriz de distancias. Para usar el escalamiento multidimensional, se requiere necesariamente que las distancias sean euclidianas (Martínez, 1995). La aplicación de esta técnica estadística a los datos provenientes de ensayos biotecnológicos agrícolas es inmediata, ya que, a partir de las bandas electroforéticas, se construyen índices de similitud y, con estos, distancias euclidianas, a las cuales se aplican las escalas multidimensionales para encontrar un plano de coordenadas principales, donde las relaciones de semejanza y divergencia entre poblaciones biológicas se discriminan y cuantifican con cierto grado de sencillez (Martínez, 1995).

Existen varios problemas asociados con la interpretación de los datos de los patrones de bandas: 1) no es usualmente conocido si una banda dada esta en un estado homo o heterocigotico (los marcadores RAPD's son tratados como caracteres dominantes); 2) Puesto que los pares alélicos no pueden ser asignados mutuamente, no es posible calcular las frecuencias alélicas para un loci específico; 3) no es conocido si las bandas comigratorias representan locis homólogos; y, 4) no es conocido si los patrones de bandas representan caracteres independientes (Harti, 1980; Weir, 1990).

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 FASE DE CAMPO**

##### **3.1.1. Ubicación**

El ensayo fue sembrado en el Area Experimental “Cabiria”, perteneciente al CATIE y ubicada en Turrialba, Costa Rica, a 602 msnm, 9° 53’ de latitud norte, 83° 38’ de longitud oeste, con una temperatura promedio diaria de 22,5°C y 2645 mm de precipitación anual.

##### **3.1.2. Material experimental, diseño experimental y manejo agronómico**

Se evaluó 31 entradas de *P. tuberosus* contenidas en el Cuadro 2. Los genotipos fueron sembrados en un Diseño Completamente al Azar con 35 repeticiones.

Cada unidad experimental estuvo constituida por una planta. El área total del ensayo fue de 1015 m<sup>2</sup>, con una distancia de siembra de 1,0 m, colocando dos semillas por golpe al momento de la siembra para luego ralea a una planta, 20 días después. Se evaluó 35 plantas por entrada. La colección fue manejada sin fertilización y con combates fitosanitarios (combate de virus) durante su ciclo de cultivo.

##### **3.1.3. Descriptores y registro**

Se utilizó la lista original de descriptores de jícama (Morera, 1992) de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE, modificada por Márquez (1992) (Cuadro 3 y 4) y se incluyó además modificaciones basadas en la morfología propia de la especie. Con el objeto de facilitar la lectura, en los mismos cuadros se anota el nombre con el que serán llamados los descriptores en el resto del texto, los cuales se indican detalladamente en los Anexos 1 y 2.

**Cuadro 2.** Detalle de las entradas de *P. tuberosus* que fueron evaluadas del Banco de Germoplasma de CATIE, 1998.

ENTRADA	PAÍS DE ORIGEN	LOCALIDAD
<i>P. tuberosus</i>		
TC-063	Bolivia (ashipa)	Yapacaní, Santa Cruz Ichilo, 400 m
TC-118	Haití (ashipa)	Parque Nac. Citadelle Sans Souci Ramiers
TC-210	Bolivia	Yungas, Chica Choropata, 1800 m
TC-238	Ecuador (jíquima)	Los Ríos, Vices
TC-239	Ecuador (jíquima)	Manabí, Rocafuerte
TC-352	Perú (chuin)	San Antonio, Río Ucayali
TC-353	Perú (chuin)	San Antonio, Río Ucayali
TC-354	Perú (chuin)	San Antonio, Río Ucayali
TC-355	Perú (chuin)	Puerto Perú, Río Ucayali
TC-359	Perú (ashipa)	Orellana, Río Ucayali
TC-361	Perú (chuin)	Conta Manillo, Río Ucayali
TC-362	Perú (chuin)	Conta Manillo, Río Ucayali
TC-525	Brasil (ashipa)	Goiânia, Minas Gerais
TC-526	Brasil (ashipa)	Goiânia, Minas Gerais
TC-530	Brasil (ashipa)	Campinas, São Paulo
TC-531	Brasil (ashipa)	Campinas, São Paulo
TC-533A*	Bolivia (ashipa)	Iturrealde, La Paz, 630 m
TC-533B*	Bolivia (ashipa)	Iturrealde, La Paz, 630 m
TC-534	Perú (ashipa)	Moyobamba, San Martín, 500-600 m
TC-535	Brasil (ashipa)	Mato Grossa, Cinta Larga
TC-536	Brasil (ashipa)	Minas Gerais, Manaos
TC-538	Perú (ashipa)	Cusco, Kosnipata, 600-700 m
TC-550	Ecuador (jíquima)	Manabí, Sozote, 200 m
TC-551	Ecuador (jíquima)	Manabí, Tosagua, El Cerro, 200 m
TC-552	Ecuador (jíquima)	Manabí, Rocafuerte, S. José de Penas, 48 m
TC-553A*	Ecuador (jíquima)	Manabí, Santa Ana, La Mocerita, 50 m
TC-553B*	Ecuador (jíquima)	Manabí, Santa Ana, La Mocerita, 50 m
TC-554C*	Ecuador (jíquima)	Manabí, Rocafuerte, Tabacales, 50 m
TC-554N*	Ecuador (jíquima)	Manabí, Rocafuerte, Tabacales, 50 m
TC-555	Ecuador (jíquima)	Manabí, Rocafuerte, Valdéz, 30 m
TC-556	Ecuador (ashipa)	Pastaza, Puyo, Tarquí, Río Chico, 960 m

\* Las letras A y B indican una subdivisión del genotipo por encontrar características morfológicas distintas; y, la N y C indican el color de la semilla negro o colorado.

**Cuadro 3.** Lista de descriptores cualitativos de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

<b>DESCRIPTORES CUALITATIVOS</b>	
<b>Carácter</b>	<b>Nomenclatura usada en el texto</b>
FLOR	
Color de los estambres	Color estambre
Color del estandarte de la flor	Color estandarte
Color de las alas de la flor	Color alas
Color de la quilla de la flor	Color quilla
Color de los sépalos de la flor	Color sépalos
Pubescencia de los sépalos	Pubescencia sépalos
Presencia de floración	Floración
TALLO	
Hábito de crecimiento	Hábito
Color del tallo	Color tallo
Velocidad del crecimiento del tallo principal	Velocidad tallo
Pubescencia del tallo	Pubescencia tallo
Longitud del entrenudo	Largo entrenudo
HOJA	
Tipo de lóbulos en el foliolo central de la hoja	Tipo lóbulo
Forma del lóbulo central del foliolo principal	Forma lóbulo
Color de la hoja madura	Color hoja
RAÍZ	
Color de la peridermis de la raíz tuberosa	Color peridermis
Defectos de la superficie de la raíz tuberosa	Defectos raíz
Forma de la raíz tuberosa	Forma raíz
Dureza de la pulpa de la raíz	Dureza pulpa
Color de la pulpa de la raíz	Color pulpa
Agrietamiento de raíces	Agrietamiento
VAINA	
Color de la vaina inmadura	Color vaina inm.
Color de la vaina en su madurez fisiológica	Color vaina mad.
Curvatura de la vaina	Curvatura vaina
Intensidad de la constricción de la vaina	Constricción vaina
Dehiscencia de la vaina madura	Dehiscencia
SEMILLA	
Color de la semilla	Color semilla
Brillo de la semilla	Brillo semilla
Forma de la semilla	Forma semilla
Susceptibilidad a la presencia de virus	Susceptibilidad virus

**Cuadro 4.** Lista de descriptores cuantitativos de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

<b>DESCRIPTORES CUANTITATIVOS</b>	
<b>Carácter</b>	<b>Nomenclatura usada en el texto</b>
<b>FLOR</b>	
Número de días a la floración	Días floración
Longitud de la flor	Largo flor
Ancho del estandarte de la flor	Ancho flor
Número de ramas/planta	Número ramas
Número de ramas con inflorescencia	Ramas/inflorescencia
Número de inflorescencias por rama	Inflorescencia/rama
Número de botones florales/inflorescencia	Botones/inflorescencia
Número de estambres	Número estambres
Largo de los estambres	Largo estambres
<b>TALLO</b>	
Longitud del tallo principal de la planta	Largo tallo
Número de nudos del tallo principal	Número nudos
<b>HOJA</b>	
Longitud del foliolo principal de la hoja	Largo foliolo
Ancho del foliolo principal de la hoja	Ancho foliolo
Relación largo/ancho de la hoja	L/A hoja
Número de hojas por planta	Número hojas
<b>RAÍZ</b>	
Ancho de la raíz	Ancho raíz
Longitud de la raíz	Largo raíz
Relación largo/diámetro de la raíz	L/A raíz
Número de raíces tuberosas por planta	Número raíces
Grosor de la corteza de la raíz	Grosor corteza
Rendimiento en fresco de raíces	Rendimiento raíces
Peso de raíz/planta	Peso raíz
Porcentaje de raíces grandes (>1000 g)	% raíces (>1000 g)
Porcentaje de raíces medianas (500-1000 g)	% raíces (500-1000 g)
Porcentaje de raíces pequeñas (<500 g)	% raíces (<500 g)
Grados brix de la raíz	Grados brix
Porcentaje de materia seca de raíces	% materia seca
<b>VAINAS</b>	
Días a la madurez fisiológica de la vaina	Días madurez
Longitud de la vaina	Largo vaina
Ancho de la vaina	Ancho vaina
Relación largo/diámetro de la vaina	L/A vaina
Número de vainas por planta	Número vainas
Número de lóculos por vaina	Número lóculos
Porcentaje de plantas fértiles	% fértiles
<b>SEMILLAS</b>	
Número de semillas por vaina	Número semillas
Rendimiento de semilla	Peso semilla
Longitud de la semilla	Largo semilla
Ancho de la semilla	Ancho semilla
Relación largo/ancho de la semilla	L/A semilla
Peso de 100 semillas a 14% de humedad	Peso 100 semillas

### 3.1.4 Análisis Estadístico

En el flujograma de la Fig. 1 se observa los análisis estadísticos realizados para la caracterización morfológica. En los siguientes acápite se detalla cada uno de los análisis.

#### 3.1.4.1. Determinación del tamaño de muestra

El número de muestras mínima se calculó con la fórmula de Steel y Torrie (1980):

$$r = \frac{2 (t_1 + t_0) S^2}{\delta^2}$$

donde:

$r$  = número de observaciones

$t_1$  = valor de  $t$  asociado al error tipo II

$t_0$  = valor de  $t$  asociado al error tipo I

$S^2$  = estimación de  $\delta^2$

$\delta^2$  = verdadera diferencia que se quiere detectar

#### 3.1.4.2. Variabilidad genética en la colección de *P. tuberosus*

Con el objetivo de obtener estimaciones de variabilidad genética se utilizó los siguientes descriptores:

- a. **Tallo:** Longitud del tallo principal, número de ramas/planta, número de nudos del tallo principal

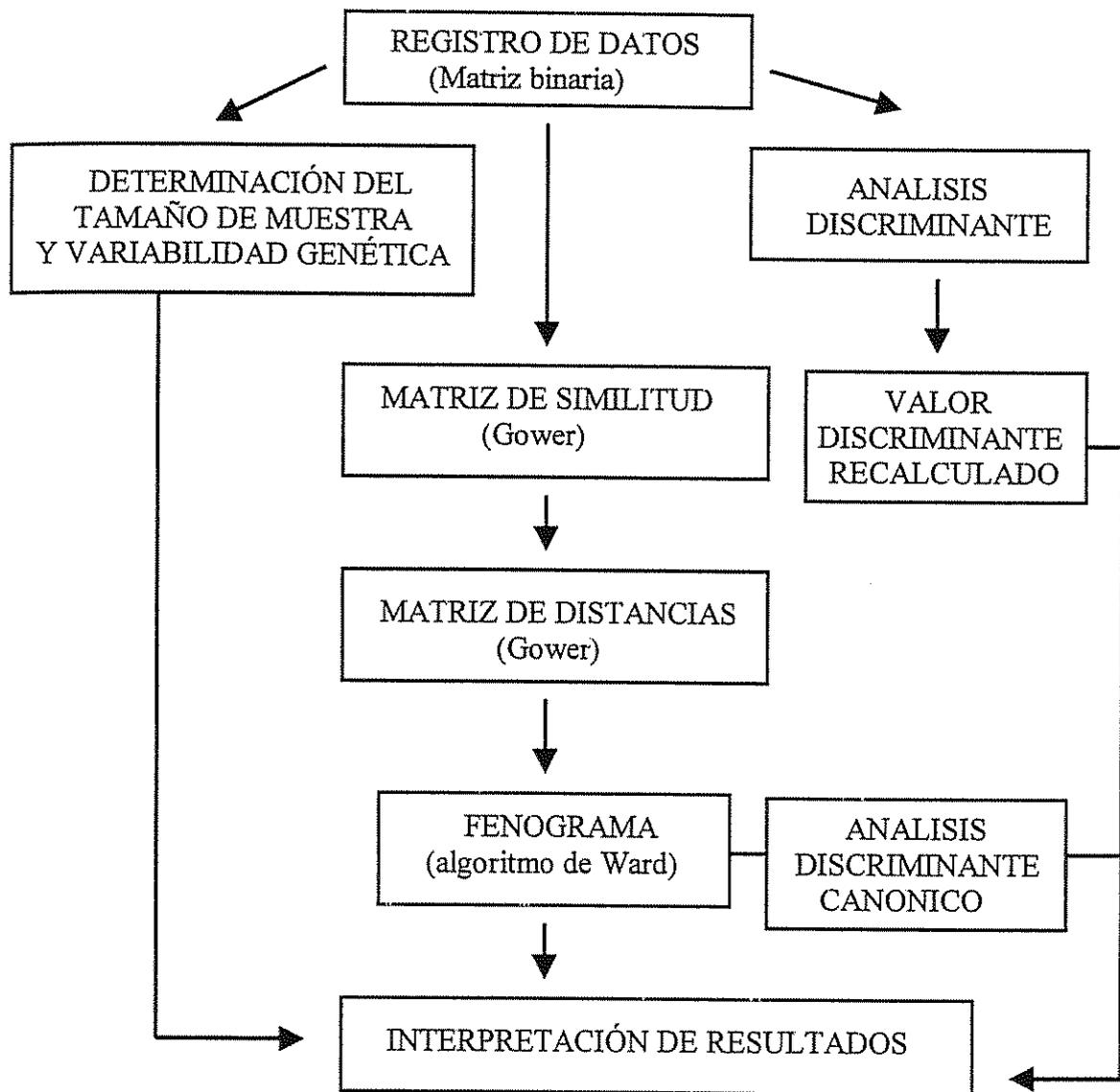


Fig. 1 Flujograma del análisis estadístico de los datos morfológicos de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

- b. **Hoja:** Longitud del foliolo principal, ancho del foliolo principal, relación largo/ancho del foliolo principal, número de hojas por planta
- c. **Flor:** Número de días a la floración, longitud del estandarte, ancho del estandarte, número de ramas con inflorescencia, número de inflorescencias por rama, número de botones florales/inflorescencia, largo de los estambres.
- d. **Vaina:** Días a la madurez fisiológica, longitud, ancho, relación largo/ancho, número de vainas por planta, número de lóculos por vaina
- e. **Semilla:** Número de semillas por vaina, peso de semilla/planta, longitud, ancho, relación largo/ancho.
- f. **Raíz:** Longitud, ancho, relación largo/ancho, número de raíces tuberosas por planta, grosor de la corteza, peso de raíz/planta, porcentaje de materia seca.

A continuación se obtuvieron los componentes de varianza utilizando el cuadrado medio esperado para cada carácter. Posteriormente los componentes fueron usados para estimar el índice de herencia en sentido amplio ( $H^2$ ), usando la siguiente fórmula:

$$H^2 = \frac{\sigma^2 G}{\sigma^2 G + \sigma^2 w = \sigma^2 F}$$

donde:

$\sigma^2 G$  = varianza genética

$\sigma^2 w$  = varianza del error

$\sigma^2 F$  = varianza fenotípica

### 3.1.4.3. Matriz de similitud, distancia y estructura taxonómica

En vista de que los caracteres utilizados son continuos o bien discretos, la estimación del parecido taxonómico entre cada par de entradas se realizó mediante ponderación de coeficientes de distancia, utilizando el paquete SAS y la distancia de Gower (1967). Para los caracteres discretos el parecido se obtuvo con el coeficiente de asociación.

$$S_{ij} = \sum s_{ij}/n$$

donde:

$n$  = número de caracteres cualitativos

$S_{ij}$  = coeficiente de asociación entre las entradas  $i$  y  $j$

Luego se transformó en una matriz de distancia ( $D1$ ), mediante el complejo  $S_{ij}$ :

$$D1_{(i,j)} = (1 - S_{ij})$$

Además se calculó una matriz de distancia Euclidiana

$$D2_{(i,j)} = \sum (X_{ki} - X_{kj})^2/n$$

$X_{ki}$  = registro estandarizado del carácter  $k$  en la entrada  $i$

$X_{kj}$  = registro estandarizado del carácter  $k$  en la entrada  $j$

Dando la matriz final

$$D = (n1 D1 + n2 D2) / (n1 + n2)$$

La estructura taxonómica de las entradas se analizaron por medio del agrupamiento jerárquico de Ward (1963).

La elección del número de grupos de entradas se hizo con los criterios de Pseudo F y Pseudo  $t^2$  utilizando el procedimiento CLUSTER del software SAS, versión 6,12.

#### 3.1.4.4. Determinación del valor discriminante entre y dentro de grupos

##### Caracteres cuantitativos

El valor discriminante se determinó a través del índice "D" de Engels (1983a) utilizando las medias de los grupos en las comparaciones múltiples de Duncan. Se utilizará para recalcular los valores de Dw, la fórmula:

$$D'w = Dw (1 - r^2)$$

Dw = promedio de los D (valor discriminante) correspondientes a cada grupo

$r^2$  = coeficiente de correlación al cuadrado entre el carácter en estudio y el más discriminante

##### Caracteres cualitativos

El valor discriminante para separar grupos se estimó con base en el análisis de frecuencias y las estadísticas de Cramer (V) (Kendall y Stuart, 1979), coeficiente de contingencia (P) (Fienberg, 1977) y Chi cuadrado ( $X^2$ ) (Cochran, 1954). El valor discriminante para diferenciar entradas dentro de grupos se determinó por medio del índice "D" de Pankhurst (1978) y de Engels (1983a), cuya fórmula es:

$$D = \frac{nI \quad x \quad nII}{N(N-1)/2}$$

nI = número de entradas que presentan el estado I

nII = número de entradas con el estado II

N = número total de entradas

## 3.2. FASE DE LABORATORIO

### 3.2.1. Ubicación

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología, perteneciente al CATIE, Turrialba, Costa Rica.

### 3.2.2. Material experimental y métodos

El material vegetal que se usó en la presente investigación fue hojas jóvenes (aproximadamente de cuatro días de producirse su apertura) congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ . La colecta se realizó de una muestra al azar de las 35 repeticiones por entrada. La metodología de extracción fue *CTAB*-minipreparaciones (Harris, 1996) usada en el Laboratorio de Biología Molecular del CATIE (Anexo 10).

Para la cuantificación del ADN se utilizó geles de agarosa (Anexo 13). Para la amplificación se utilizaron “primers” de las empresas Operon Technology INC. y de University of British Columbia (UBC). Los “primers” vienen a 10  $\mu\text{g}$  por tubo, los cuales se diluyeron en TE (Anexo 12) a una solución madre de 25  $\mu\text{M}$ , dependiendo del peso molecular de cada uno de ellos. En el caso de los “primers” Operon se evaluaron 60, de los sets A (OPA), B (OPB) y H (OPH) (20 “primers” por set); y, de los UBC se evaluó 26 “primers” (1-10; 35-39; 70-74; 101-105; 535) (Cuadro 5). Se realizó las pruebas correspondientes para fijar la concentración adecuada de c/u de los “primers”; posteriormente se evaluó con 8 genotipos representativos de la variabilidad existente en la colección. Por último se seleccionaron los “primers” polimórficos y se corrió las 31 entradas de jícama con cada uno de ellos.

La amplificación se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR System 9600, con el siguiente programa: un ciclo inicial de desnaturalización (apertura de la cadena de ADN), 3 minutos a  $94^{\circ}\text{C}$ ; 45 ciclos de 30 segundos a  $94^{\circ}\text{C}$  (desnaturalización), 45

Cuadro 5. Lista de "primers" evaluados para *P. tuberosus*. CATIE, 1998

PRIMER	SECUENCIA BASES (5' a 3')	PRIMER	SECUENCIA BASES (5' a 3')
OPA1	CAGGCCCTTC	OPH4	GGAAGTCGCC
OPA2	TGCCGAGCTG	OPH5	AGTCGTCCCC
OPA3	AGTCAGCCAC	OPH6	ACGCATCGCA
OPA4	AATCGGGCTG	OPH7	CTGCATCGTG
OPA5	AGGGGTCTTG	OPH8	GAAACACCCC
OPA6	GGTCCCTGAC	OPH9	TGTAGCTGGG
OPA7	GAAACGGGTG	OPH10	CCTACGTCAG
OPA8	GTGACGTAGG	OPH11	CTTCCGCACT
OPA9	GGGTAACGCC	OPH12	ACGCGCATGT
OPA10	GTGATCGCAG	OPH13	GACGCCACAC
OPA11	CAATCGCCGT	OPH14	ACCAGGTTGG
OPA12	TCGGCGATAG	OPH15	AATGGCGCAG
OPA13	CAGCACCCAC	OPH16	TCTCAGCTGG
OPA14	TCTGTGCTGG	OPH17	CACTCTCCTC
OPA15	TTCCGAACCC	OPH18	GAATCGGCCA
OPA16	AGCCAGCGAA	OPH19	CTGACCAGCC
OPA17	GACCGCTTGT	OPH20	GGGAGACATC
OPA18	AGGTGACCGT	UBC1	CCTGGGCTTC
OPA19	CAAACGTCGG	UBC2	CCTGGGCTTG
OPA20	GTTGCGATCC	UBC3	CCTGGGCTTA
OPB1	GTTTCGCTCC	UBC4	CCTGGGCTGG
OPB2	TGATCCCTGG	UBC5	CCTGGGTTCC
OPB3	CATCCCCCTG	UBC6	CCTGGGCCTA
OPB4	GGACTGGAGT	UBC7	CCTGGGGGTT
OPB5	TGCGCCCTTC	UBC8	CCTGGCGGTA
OPB6	IGCTCTGCCC	UBC9	CCTGCGCTTA
OPB7	GGTGACGCAG	UBC10	GGGGGGATTA
OPB8	GTCCACACGG	UBC35	CCGGGGTTAA
OPB9	TGGGGGACTC	UBC36	CCCCCTTAG
OPB10	CTGCTGGGAC	UBC37	CCGGGGTTTTI
OPB11	GTAGACCCGT	UBC38	CCGGGGAAAA
OPB12	CCTGACGCA	UBC39	TTAACCGGGC
OPB13	TTCCCCGCT	UBC70	GGGCACGCGA
OPB14	TCCGCTCTGG	UBC71	GAGGGCGAGG
OPB15	GGAGGGTGT	UBC72	GAGCACGGGA
OPB16	TTTGCCCGGA	UBC73	GGGCACGCGA
OPB17	AGGGAACGAG	UBC74	GAGCACCTGA
OPB18	CCACAGCAGT	UBC101	GCGGCTGGAG
OPB19	ACCCCCGAAG	UBC102	GGTGGGGACT
OPB20	GGACCCTTAC	UBC103	GTGACCCGC
OPH1	GGTCGGAGAA	UBC104	GGGCAATGAT
OPH2	TCGGACGTGA	UBC105	CTCGGGTGGG
OPH3	AGACGTCCAC	UBC535	CCACCAACAG

A = Adenina C = Citocina G = Guanina T = Timina

segundos a 36°C “annealing” (unión del “primer” a sitios complementarios de la cadena disociada); y, 2 minutos a 72°C de síntesis (síntesis de la cadena en una dirección específica). Un ciclo final de 4 minutos a 72°C. La metodología usada para el análisis RAPD se describe en el Anexo 16.

Finalmente las muestras fueron sometidas a una electroforesis (Anexo 13) y luego se realizó la calificación de las bandas polimórficas encontradas en los “primers” antes mencionadas, asignando un 1 en caso de que la banda estuviera presente y un 0 si estaba ausente.

### 3.2.3. Análisis Estadístico

Los análisis estadísticos realizados se observan en el flujograma de la Fig. 2. A continuación se detalla en forma resumida cada uno de ellos.

#### 3.2.3.1. Matriz de similitud y distancias

Para obtener la matriz de distancias genéticas se usó el algoritmo de Nei y Li (1979) utilizando el software PopGene (Yeh *et al*, 1997). Se calculó el coeficiente de similaridad cuya fórmula es:

$$S = \frac{2a}{2a + b + c}$$

donde:

S = coeficiente de similaridad

a = número de bandas presentes en ambos genotipos

b = número de bandas presentes sólo en un genotipo

c = número de bandas presentes en el otro genotipo

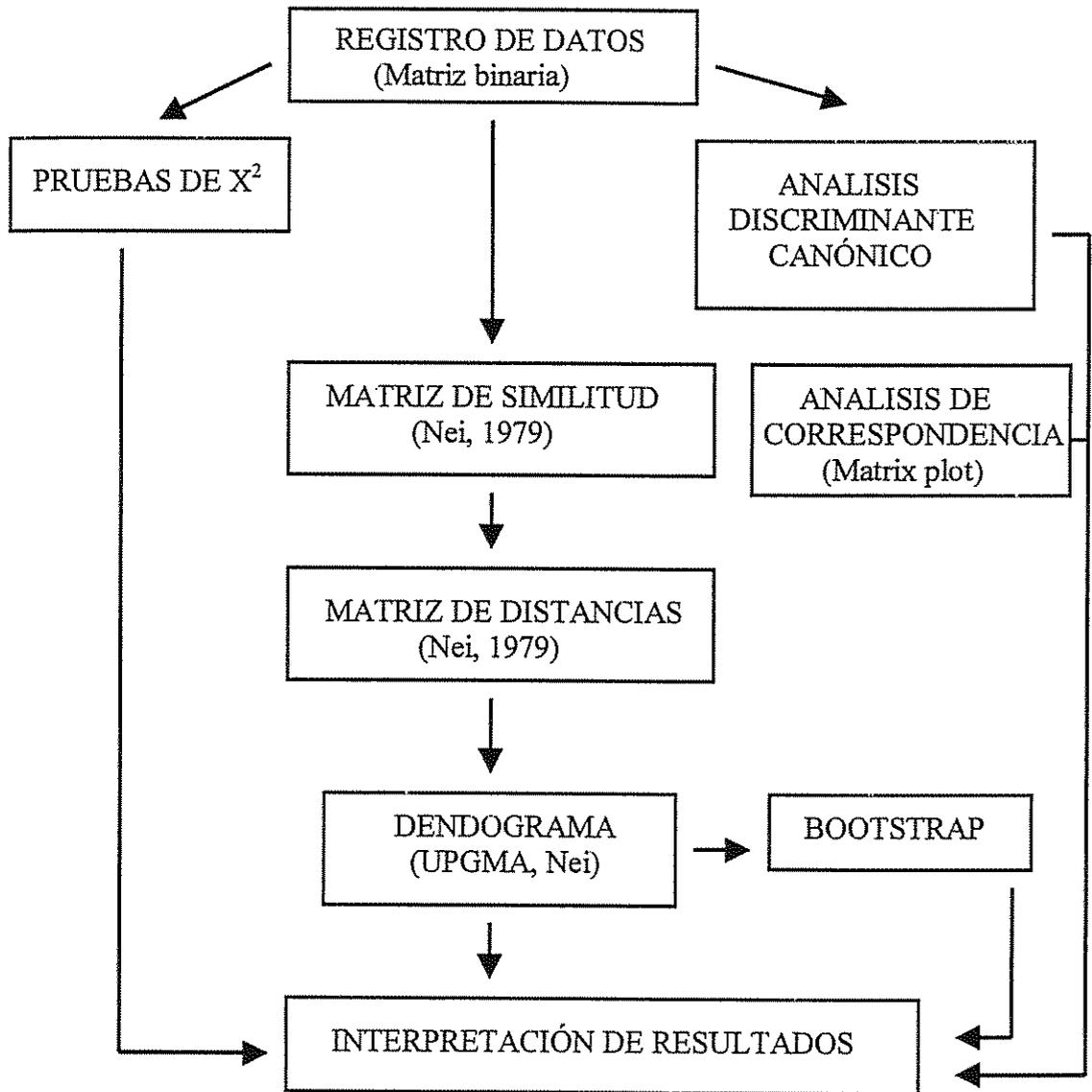


Fig. 2. Flujograma del análisis de los datos moleculares generados mediante la metodología RAPDs en la colección de *P. tuberosus* del CATIE, 1998.

Una vez calculado el coeficiente de similaridad, se procedió al cálculo de la distancia que es una función decreciente de la similaridad. Esta se calculó con la siguiente fórmula:

$$D_1 = 1 - S$$

### 3.2.3.2. Dendograma

Los dendogramas fueron generados usando también PopGene (Yeh *et al*, 1997). El árbol se construye a partir de la consideración de cada individuo como un grupo, y uniendo los individuos o grupos más similares hasta llegar a un solo grupo. El dendograma se generó en base de las distancias de Nei y Li (1979) con el método UPGMA “Unweighted Pair-Group Method, Arithmetic Mean”.

### 3.2.3.3. “*Bootstrap*”

La técnica “*Bootstrap*” consiste en tomar muestras (con reemplazamiento) de los elementos que constituyen la muestra original. Cada genotipo se expresa en un perfil de n bandas. Se elige aleatoriamente muestras de n bandas, pero, al ser con reemplazamiento, una banda específica puede estar considerada más de una vez. Cada muestra dio información para todos los genotipos en términos de las bandas que los definen. Por lo tanto, cada muestra dio lugar a una matriz de similaridad y una matriz de distancia (Duque, 1998).

En el árbol o dendograma ya obtenido de la muestra inicial aparece el punto donde se unen el genotipo i y el j. Con esta información, se pudo consultar de cada muestra “*bootstrap*” el valor de distancia entre i y j. Con un número adecuado de muestras, que en nuestro caso fue 2000, se calculó el valor promedio para las distancias i y j; lo cual nos dio una opinión objetiva sobre la significancia y fuerza de las ramas que contienen a los diferentes grupos (Duque, 1998).

### 3.2.3.4. Pruebas de $X^2$ , análisis discriminante canónico y análisis de correspondencia

Tanto las pruebas de  $X^2$  como el análisis discriminante canónico se utilizaron para identificar las bandas polimórficas que más aportan para la diferenciación de las entradas. La prueba de  $X^2$  se realizó con el software PopGene (Yeh *et al*, 1997) y el análisis discriminante canónico con el software SAS versión 6.12. El análisis de correspondencia se realizó con el software NTSYS-pc (Applied Biostatistics Inc., 1994).

### 3.2.3.5. Relación de grupos de datos morfológicos y moleculares

Como se indica en el flujograma de la Fig. 3, para el estudio de la relación de los dos tipos de grupos de datos para la caracterización morfológica y molecular se procedió de la siguiente manera: 1) Se utilizó las matrices de distancia moleculares “X” (Nei y Li, 1979) y las morfológicas “Y” (Dgower); y se correlacionó entre ellas con el estadístico Mantel (Mantel, 1967) que se define como:

$$Z = \sum_j \sum_k X_{jk} Y_{jk}$$

$X_{jk}$  y  $Y_{jk}$  = son elementos de  $j$ s líneas y  $k$ s columnas de  $X_{n \times n}$  y  $Y_{n \times n}$ , respectivamente, y  $k$  es  $< j$ .

El estadístico Mantel no provee un análisis paramétrico de la  $H_0$ : el valor de un elemento de  $X$  no es relativo al valor del correspondiente elemento de  $Y$ . Sin embargo, la distribución de  $Z$  particularmente para  $X$  y  $Y$  puede ser derivada calculando  $Z$  para cada posible permutación de las matrices y entonces los  $Z$  observados pueden ser determinados (Hubert, 1983). Es decir,  $Z$  fue estimado de una muestra al azar de todas las posibles permutaciones de las matrices, las cuales fueron generadas por MXCOMP del software NTSYS-pc (Applied Biostatistics Inc., 1994).

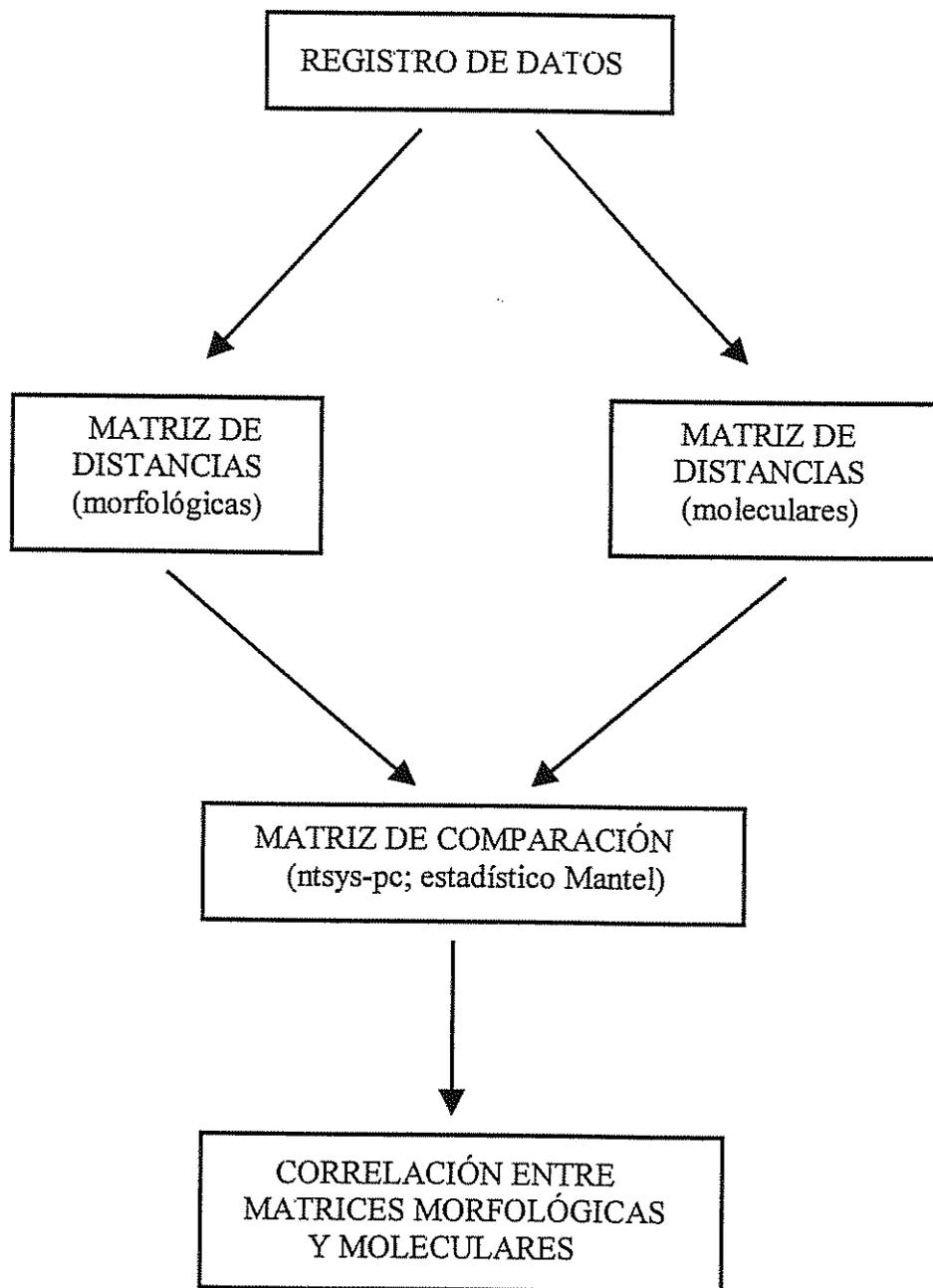


Fig. 3. Flujograma del análisis de relación entre los datos morfológicos y moleculares de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

## 4. RESULTADOS

### 4.1. FASE DE CAMPO

#### 4.1.1. Tamaño de muestra

La muestra mínima para los caracteres cualitativos y cuantitativos fue calculada por medio de la fórmula de Steel y Torrie (1980). En la presente investigación se utilizó una probabilidad del 5%, es decir, cuando en el 95% de los casos, el promedio de la muestra está dentro del rango del 5% de la media verdadera de la población.

En investigaciones realizadas en cacao (*Theobroma cacao*) por Enríquez (1966) y Pound (1932), y en pejibaye (*Bactris* spp.) por Morera (1981), se utilizó la probabilidad antes mencionada, porque se considera que da una adecuada confiabilidad en este tipo de estudios.

Para los caracteres cualitativos se determinó que los tamaños mínimos de muestra oscilaron entre una y tres muestras. En el caso de los caracteres cuantitativos la variación fue muy grande, como se muestra en el Cuadro 6; presentando con una precisión del 5% valores tamaños de muestra entre 1363 y 20 para los caracteres grosor de la corteza de la raíz y L/A del foliolo de la hoja, respectivamente. Además del coeficiente de variación de cada descriptor, en este cuadro se incluye, el tamaño mínimo de muestra usando cuatro diferentes límites de error (5, 10, 25 y 50%), lo cual es un indicativo de la precisión con que se desee trabajar. Para mantener un nivel de confianza grande, en esta investigación se seleccionaron límites de confianza inferiores al 25%. Con base en la experiencia adquirida en el ensayo de campo, se decidió además que el tamaño máximo de muestras idealmente no debería superar las 60, sobre todo en aquellos caracteres que fueran más laboriosa la toma de datos como largo y ancho de la raíz, botones florales por inflorescencia, número de hojas.

**Cuadro 6.** Tamaño de muestra mínima de caracteres cuantitativos a diferentes límites de error según la fórmula de Steel y Torrie (1980) de la colección de *P. tuberosus* del CATIE, 1998.

DESCRIPTOR	TAMAÑO DE MUESTRA			
	(probabilidad al 5%)			
	Límite de error			
	5%	10%	25%	50%
<i>V. cuantitativas</i>				
Días floración	85	21	3	1
Largo flor	149	37	6	2
Ancho flor	95	24	4	1
Número ramas	489	122	19	5
Ramas/inflorescencia	479	120	19	5
Inflorescencia/rama	147	37	6	2
Botones/inflorescencia	298	74	12	3
Largo estambres	200	50	8	2
Largo tallo	68	17	3	1
Número nudos	105	26	4	1
Largo foliolo	594	148	24	6
Ancho foliolo	182	45	7	2
L/A hoja	20	5	1	0
Número hojas	140	35	6	2
Ancho raíz	284	71	11	3
Largo raíz	583	146	23	6
L/A raíz	122	30	5	1
Grosor corteza	1363	341	54	14
Peso raíz	334	84	13	3
Grados brix	439	110	18	4
Días madurez	50	12	2	0
Largo vaina	331	83	13	4
Ancho vaina	74	18	3	1
L/A vaina	149	37	6	2
Número vainas	781	195	31	8
Número lóculos	323	80	13	3
Número semillas	260	65	10	3
Peso semilla	539	135	21	5
Largo semilla	213	53	8	2
Ancho semilla	233	58	9	2
L/A semilla	423	105	17	4
% materia seca	122	31	5	1
Número raíces	301	75	12	3

Se encontró que con el límite de error más bajo (5%), sólo era posible seleccionar dos variables que llenaron los requisitos señalados: "L/A hoja" y "días a madurez". Con un límite de error al 10% se pueden evaluar las siguientes variables: número de días a la floración, longitud de la flor, número de inflorescencias por rama, largo de los estambres, longitud del tallo principal, número de nudos del tallo principal, ancho del foliolo, relación L/A del foliolo principal de la hoja, número de hojas por planta, relación L/A de la raíz, días a la madurez fisiológica, ancho de la vaina, relación L/A de la vaina, largo y ancho de la semilla y porcentaje de materia seca. También es factible en este límite de error evaluar el número de semillas (65 muestras). Sin embargo, resulta muy difícil evaluar variables como: número de ramas, ramas/inflorescencia, botones/inflorescencia, largo del foliolo, largo y ancho de la raíz, grosor de la corteza, peso de la raíz, grados brix, largo de la vaina, número de vainas, número de lóculo/vaina, peso de la semilla, L/A de la semilla y número de raíces; las cuales aún al 25% de precisión requieren cantidades grandes de muestras para alcanzar una adecuada definición de ellas.

#### **4.1.2. Caracterización morfológica**

##### **4.1.2.1. Variabilidad genética de la colección de *P. tuberosus***

En el Cuadro 7 se presenta el promedio, desviación estándar, coeficiente de variación e índice de herencia en sentido amplio para los 32 caracteres cuantitativos de la colección. El CV del conjunto de caracteres estuvo entre 5,4% (longitud de la flor) y 88,6% (peso de la raíz tuberosa por planta). Los caracteres más variables fueron: peso de la raíz por planta (88,6%), peso de la semilla por planta (73,9%), grosor de la corteza de la raíz (66,8%), número de vainas por planta (66,1%), número de tubérculos por planta (42%) y número de ramas con inflorescencia (40,5%). Los caracteres con menos variación fueron: longitud de la flor (5,4%), longitud de la semilla (6,5%), ancho de la semilla (7,1%), ancho del estandarte (7,2%), largo de los estambres (7,2%), relación L/A de la semilla (7,5%), días a la madurez fisiológica (7,9%), relación L/A de la hoja (8,2%) y ancho de la vaina (8,6%).

**Cuadro 7.** Promedio (PROM.), desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV) e índice de herencia ( $H^2$ ), de 32 caracteres cuantitativos de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

CARACTER	PROM.	DE	CV %	$H^2$
Número de días a la floración	103,3	42,9	18,8	0,80
Longitud de la flor (mm)	23,6	2,1	5,4	0,63
Ancho del estandarte de la flor (mm)	18,1	2,6	7,2	0,76
Número de ramas por planta	1,9	0,9	39,3	0,38
Número de ramas con inflorescencia	1,7	0,9	40,5	0,45
Número de inflorescencias por rama	11,6	6,4	28,4	0,74
Número de botones florales por inflorescencia	16,4	8,5	37,1	0,49
Largo de los estambres (mm)	20,7	2,2	7,2	0,55
Longitud del tallo principal de la planta (cm)	226,2	195,1	29,2	0,88
Número de nudos del tallo principal	23,5	10,3	24,5	0,69
Longitud del foliolo principal de la hoja (cm)	11,3	2,5	19,1	0,26
Ancho del foliolo principal de la hoja (cm)	11,9	4,2	21,8	0,61
Relación largo/ancho del foliolo principal de la hoja	1,0	0,4	8,2	0,95
Número de hojas por planta	38,2	18,8	29,2	0,65
Longitud de la raíz (cm)	10,4	4,4	32,2	0,43
Ancho de la raíz (cm)	14,8	5,4	30,9	0,29
Relación largo/ancho de la raíz	1,6	0,9	37,1	0,57
Grosor de la corteza de la raíz (mm)	0,9	0,6	66,8	0,05
Peso de la raíz por planta (g)	1063,3	1151,5	88,6	0,34
Número de raíces tuberosas por planta	1,3	0,7	42,0	0,39
Porcentaje de materia seca/planta	21,8	6,8	18,3	0,66
Días a la madurez fisiológica de la vaina	207,5	36,8	7,9	0,81
Longitud de la vaina (cm)	18,4	3,2	12,9	0,44
Ancho de la vaina (cm)	1,9	0,4	8,6	0,78
Relación largo/ancho de la vaina	9,8	2,3	13,7	0,67
Número de vainas por planta	17,8	13,2	66,1	0,21
Número de lóculos por vaina	8,3	1,7	14,5	0,50
Número de semillas por vaina	7,6	1,9	17,2	0,53
Peso de la semilla por planta (g)	61,2	54,0	73,9	0,30
Longitud de la semilla (mm)	11,1	1,0	6,5	0,49
Ancho de la semilla (mm)	8,1	0,8	7,1	0,49
Relación largo/ancho de la semilla	1,4	0,1	7,5	0,27

El índice de heredabilidad presentó valores altos para caracteres relacionados para prácticamente todas las partes de la planta, a excepción de la raíz. Los caracteres con los mayores valores fueron: relación L/A del foliolo principal de la hoja (0,95), longitud del tallo principal de la planta (0,88), días a la madurez fisiológica de la vaina (0,81) y número de días a la floración (0,80). Los caracteres con baja heredabilidad como, ancho de la raíz, número de vainas por planta, grosor de la corteza de la raíz y longitud del foliolo principal de la hoja, presentaron valores de 0,05; 0,21; 0,26 y 0,29; respectivamente.

Los promedios obtenidos por grupos genéticos definidos por Sørensen (1996): ashipas, chuines y jíquimas, indican que los caracteres que mejor los diferencian (Duncan, 1975) son: días a la floración, largo de la flor, ancho del estandarte de la flor, número de botones florales por inflorescencia, largo de los estambres, largo del tallo principal, número de ramas con inflorescencia, ancho del foliolo principal de la hoja, relación L/A de la hoja y días a la madurez fisiológica (Cuadro 8).

#### **4.1.2.2. Agrupamiento de las entradas**

El resultado del agrupamiento de las entradas obtenido con el método Gower (1967) del paquete estadístico SAS, mediante la matriz de distancia ponderada de la combinación de coeficientes de distancia para los caracteres cualitativos y cuantitativos se observa en el Anexo 3, que resume las relaciones entre la totalidad de pares de genotipos. El algoritmo multivariado del análisis de agrupamiento jerárquico de Ward (1963), actuó sobre la matriz de distancia, obteniéndose como resultado del análisis cuatro grupos de entradas cuya distribución se indica en el Cuadro 9.

Ward (1963). produjo cuatro grupos diferentes, tres de los cuales coinciden con la clasificación etnobotánica propuesta por Sørensen (1996). Se formó un cuarto grupo formado únicamente por ashipas.

**Cuadro 8.** Valores promedios para 32 caracteres distintivos en tres grupos genéticos de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

CARACTER	GRUPOS		
	ASHIPAS (Prom.)	JÍQUIMAS (Prom.)	CHUINES (Prom.)
<i>V. cuantitativas</i>			
Días floración	94,4 B <sup>1/</sup>	73,5 C	180,1 A
Largo flor	24,2 B	21,6 C	25,5 A
Ancho flor	19,6 A	18,0 B	13,8 C
Número ramas	2,4 A	1,3 C	1,8 B
Ramas/inflorescencia	2,3 A	1,3 B	1,1 B
Inflorescencia/rama	10,0 B	16,7 A	7,6 B
Botones/inflorescencia	20,4 A	9,6 C	16,8 B
Largo estambres	20,9 B	18,8 C	23,3 A
Largo tallo	251,6 B	61,8 C	426,8 A
Ancho foliolo	12,1 B	14,8 A	6,6 C
L/A hoja	0,9 B	0,8 C	1,8 A
Número hojas	40,6 A	27,2 B	49,7 A
Ancho raíz	11,1 A	10,9 A	7,1 B
Largo raíz	14,4 B	13,4 B	17,4 A
L/A raíz	1,5 B	1,3 B	2,7 A
Grosor corteza	0,9 B	0,9 B	1,2 A
Peso raíz	1375,8 A	911,5 AB	521,7 B
Grados brix	6,6 B	7,0 B	7,5 A
Días madurez	216,9 B	176,0 C	287,0 A
Ancho vaina	2,1 A	1,7 B	2,1 A
L/A vaina	8,7 B	11,6 A	9,2 B
Número vainas	20,6 A	16,7 A	8,4 B
Número lóculos	7,9 B	9,1 A	7,0 B
Número semillas	7,1 B	8,7 A	6,1 B
Peso semilla	72,3 A	58,0 A	9,9 B
Largo semilla	11,4 A	10,7 B	11,4 A
Ancho semilla	8,4 A	7,5 B	8,3 A
L/A semilla	1,35 B	1,42 A	1,37AB
% materia seca	20,0 B	19,3 B	30,3 A
Número raíces	1,6 A	1,1 B	1,1 B

1/ Promedios con la misma letra en cada hilera tienen su diferencia significativa al nivel del 5%. Método de Duncan (1975).

Es así, que las entradas del grupo 1 (G1) corresponden a las denominadas ashipas, el grupo 2 (G2) a los chuines, grupo 3 (G3) a las jíquimas y el grupo 4 (G4) a cuatro entradas de ashipas (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Distribución de las entradas por grupo, según el análisis de agrupamiento jerárquico de Ward. CATIE, 1998.

<b>GRUPO 1 (Ashipas)</b>	<b>GRUPO 2 (Chuines)</b>	<b>GRUPO 3 (Jíquimas)</b>	<b>GRUPO 4 (Ashipas)</b>
TC-530	TC-359	TC-239	TC-531
TC-550	TC-554C	TC-555	TC-556
TC-526	TC-355	TC-553B	TC-534
TC-210	TC-362	TC-554N	TC-535
TC-352	TC-361	TC-551	
TC-536	TC-353	TC-552	
TC-063	TC-354	TC-238	
TC-118		TC-538	
TC-525			
TC-533A			
TC-533B			
TC-553A			

#### 4.1.2.3. Valor discriminante de los caracteres para separar grupos

##### 4.1.2.3.1. Caracteres cualitativos

De los 24 caracteres analizados mediante la prueba de  $X^2$  (Cochran, 1954), se detectó 19 de ellos con alta significancia (1%), uno con significancia al 5% y solamente cuatro no significativos (Cuadro 10). Estos resultados indican que existe un gran número de descriptores que hacen un importante aporte para separar los cuatro diferentes grupos genéticos, pues además presentaron altos coeficientes de asociación. En el mismo Cuadro se indica 10 caracteres elegidos por su mayor valor discriminante, que pueden utilizarse para establecer diferencias entre grupos genéticos.

**Cuadro 10.** Caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de *P. tuberosus*, CATIE, 1998.

CARACTER	X <sup>2</sup>	COEFIC. (P)	CRAMER (V)
Forma del lóbulo del foliolo central de la hoja <sup>a</sup>	59,2**	1,38	0,80
Tipo de lóbulos en el foliolo central de la hoja <sup>a</sup>	53,1**	1,31	0,76
Color de la pulpa de la raíz <sup>a</sup>	47,4**	1,24	0,71
Forma de la semilla <sup>a</sup>	43,3**	1,18	0,89
Velocidad de crecimiento del tallo principal <sup>a</sup>	41,0**	1,15	0,81
Color de los sépalos de la flor <sup>a</sup>	38,2**	1,11	0,64
Color del tallo <sup>a</sup>	36,6**	1,09	0,77
Hábito de crecimiento <sup>a</sup>	36,0**	1,07	0,62
Curvatura de la vaina <sup>a</sup>	31,8**	1,01	0,58
Color de la vaina inmadura <sup>a</sup>	31,0**	1,00	1,00
Longitud del entrenudo	29,3**	0,97	0,56
Dureza de la pulpa de la raíz	27,8**	0,95	0,55
Pubescencia de los sépalos	27,1**	0,94	0,94
Color del estandarte de la flor	27,0**	0,93	0,66
Color de las alas de la flor	27,0**	0,93	0,66
Color de la quilla de la flor	27,0**	0,93	0,66
Susceptibilidad a la presencia de virus	26,1**	0,92	0,92
Pubescencia del tallo	24,4**	0,89	0,51
Intensidad de la constricción de la vaina	24,3**	0,88	0,88
Color de la semilla	23,2*	0,86	0,50
Color de la vaina en su madurez fisiológica	22,9**	0,86	0,61
Color de la peridermis de la raíz tuberosa	20,8 <sup>ns</sup>	0,82	0,47
Brillo de la semilla	16,0**	0,72	0,72
Forma de la raíz tuberosa	15,2 <sup>ns</sup>	0,70	0,40
Defectos de la superficie de la raíz tuberosa	15,0 <sup>ns</sup>	0,70	0,40
Agrietamiento de raíces	13,2**	0,65	0,65
Color de la hoja madura	4,0 <sup>ns</sup>	0,36	0,36

<sup>a</sup> = Caracteres elegidos como los más discriminantes para separar los tres grupos genéticos: ashipas, chuines y jíquimas

\*\* = Significativo al 1% de probabilidad

\* = Significativo al 5% de probabilidad

ns = no significativo

La forma y el tipo del lóbulo del foliolo central de la hoja fueron los caracteres con el mayor valor discriminante (59,2 y 53,1 respectivamente) y con los más altos coeficientes de asociación. La forma de la semilla presentó un valor de  $X^2$  (43,3) y el mayor valor según la prueba de Cramer (Kendall y Stuart, 1979) (0,89), por lo tanto, tiene una alta contribución para discriminar entre grupos genéticos, al igual que los dos anteriores caracteres.

#### 4.1.2.3.2. Caracteres cuantitativos

Según Engels (1983a), un carácter para el cual los cuatro grupos tengan valores marcadamente distintos, tendrá un valor "D" máximo de 1, por cuanto las cuatro comparaciones posibles serán todas significativas. En el Cuadro 11 se observa los cinco caracteres con mayor valor discriminante observándose que descriptores de la hoja y vaina, así como días a la floración y madurez fisiológica fueron los que permitieron diferenciar los cuatro grupos, tal como se refería en el valor promedio. Además, se detectó que las entradas dentro de los grupos mantienen una relación estrecha, es decir, no existe mucha variación ya que presentan valores pequeños de desviación estándar.

Para la variable días a la floración, el grupo de las jíquimas fue el más precoz con 73,5 días y el más tardío el grupo de los chuines con 180,1 días. La misma situación se dio para la variable días a la madurez fisiológica de las vainas con valores de 174,8 para el G3 y 287 días para el G2. Por otro lado, el G3 presentó el mayor ancho de foliolo con 15,4 cm e inversamente el menor ancho de vaina con 1,63 cm. Contrariamente, el G4 (ashipas) fue el que tuvo el mayor ancho de vaina con 2,61 cm y el G2 el menor ancho de foliolo con 6,6 cm (Cuadro 11).

En todos los casos con excepción del ancho del foliolo principal de la hoja, los valores obtenidos por los grupos se acomodaron de acuerdo al siguiente orden de menor a mayor: G3, G1, G4 y G2 (Cuadro 11)

**Cuadro 11.** Caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

GRUPOS	CARACTER				
	Días floración	Ancho foliolo	L/A foliolo	Días madurez	Ancho vaina
3 (jíquima)	73,5±6,00*	15,4±1,41	0,77±0,01	174,8±15,99	1,66±0,09
1 (ashipas)	85,7±6,31	11,6±1,33	0,87±0,05	206,9±9,88	1,90±0,11
4 (ashipas)	115,1±6,85	13,3±0,62	0,98±0,02	239,2±7,79	2,61±0,05
2 (chuines)	180,1±4,20	6,6±0,43	1,81±0,04	287,0±5,77	2,06±0,02
<b>Valor "D"</b>	1	1	1	1	1

\* = Promedio del carácter para el grupo y desviación estándar

#### 4.1.2.4. Valor discriminante de los caracteres para separar entradas dentro de grupos

##### 4.1.2.4.1. Caracteres cualitativos

En el Cuadro 12, se presenta el valor "D" y los estados de los caracteres cualitativos. Considerando los caracteres en forma independiente y según el orden decreciente de los mismos, se infiere que al igual que los caracteres cualitativos que separan entre grupos genéticos, la forma y tipo de lóbulo del foliolo central de la hoja presentan los valores más altos (0,72 y 0,705, respectivamente) para discriminar entre entradas dentro de cada grupo. De igual forma, el hábito de crecimiento fue otro carácter con un valor alto (0,716). Además, se observaron otros caracteres con valores altos como dureza de la pulpa de la raíz, defectos de la superficie de la raíz, color de la semilla y forma de la raíz, entre los más discriminantes.

**Cuadro 12.** Caracteres cualitativos para separar entradas de la colección de *P. tuberosus*, según el valor discriminante "D". CATIE, 1998

CARACTERES	ESTADOS	VALOR "D"
Forma del lóbulo central del foliolo principal de la hoja *	5	0,720
Hábito de crecimiento	4	0,716
Tipo de lóbulos en el foliolo central de la hoja *	6	0,705
Dureza de la pulpa de la raíz	4	0,697
Color de los sépalos de la flor	4	0,695
Defectos de la superficie de la raíz	7	0,684
Color de la semilla	5	0,664
Velocidad de crecimiento del tallo principal	5	0,654
Forma de la semilla	5	0,636
Forma de la raíz	9	0,634
Longitud del entrenudo	4	0,617
Curvatura de la vaina *	4	0,591
Color de la pulpa de la raíz	5	0,561
Color de la peridermis de la raíz	5	0,520
Brillo de la semilla	3	0,516
Pubescencia del tallo	5	0,514
Color de la vaina en la madurez fisiológica	3	0,514
Color del estandarte de la flor	3	0,512
Color de las alas de la flor	3	0,512
Color de la quilla de la flor	3	0,512
Intensidad de la constricción de la vaina	3	0,512
Pubescencia de los sépalos	6	0,490
Color del tallo	3	0,456
Susceptibilidad a virus	3	0,426
Color de la hoja madura	2	0,396
Color de la vaina inmadura *	2	0,396
Propensión al resquebrajamiento de la corteza de la raíz	2	0,232

\* = Caracteres elegidos como los más discriminantes entre entradas, una vez que se recalculó los valores

Los valores de "D" tomando en cuenta el valor más alto (0,72) fueron recalculados mediante la fórmula de Engels (1983a)  $D'=D(1-r^2)$ , para el resto de caracteres, notándose que el tipo del lóbulo central del foliolo de la hoja nuevamente se ubicó en segundo lugar con un valor de 0,61. Nuevamente se recalculó los valores de D' para el resto de caracteres considerando ahora la correlación de éstos con el tipo de lóbulo, encontrándose que el color de la vaina inmadura (0,40) y la curvatura de la vaina (0,34) fueron los que se ubicaron en tercer y cuarto lugar.

Los caracteres que presentaron el mayor número de estados fueron los asociados con la raíz, como los defectos de la superficie, con siete estados y la forma con nueve estados. Se puede notar que a medida que disminuye el valor discriminante o que los caracteres contribuyen a la similitud de las entradas, menor es el número de estados, observándose que los caracteres relacionados con el color del tallo, hoja y vaina inmadura, son los que presentan tres o dos estados (Cuadro 12).

#### 4.1.2.4.2. Caracteres cuantitativos

En el Cuadro 13 se presenta el promedio con su desviación estándar y los valores "D" y "Dw" (para cada carácter). El valor "D" es un indicador de similitud. Entre menor sea más similares serán los genotipos en el grupo correspondiente. Se observa en el cuadro que para los diferentes caracteres, los máximos valores se alcanzan en el G1, lo que indica que es más diverso que los otros. Por el contrario, el G4 con valores muy bajos para todas las partes de la planta, tiene entradas con una relación muy estrecha entre ellas, así mismo, el G2 presenta valores bajos pero solamente para los caracteres relacionados con la vaina. El G1 tuvo los mayores valores "D" para los caracteres longitud de la semilla (0,74) y porcentaje de materia seca por planta (0,68). Por otro lado, el G2 presentó para el número de inflorescencias por rama un valor de 0,76, siendo el carácter que mejor separa entre entradas en este grupo. En el G3, la longitud de la raíz se constituyó en la variable más discriminante con 0,64. Por último, el G4 tuvo al carácter peso de semilla por planta como el que diferencia mejor entre entradas con un valor de 0,66.

**Cuadro 13.** Promedio, valor discriminante "D" y "Dw" para los caracteres cuantitativos, en el agrupamiento de entradas de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

CARÁCTER	G1 (12)		G2 (7)		G3 (8)		G4 (4)*	
	Pro.	"D"	Pro.	"D"	Pro.	"D"	Pro.	"D"
Relación largo/ancho de raíz	1,3 ± 0,6	0,67	2,7 ± 0,2	0,67	1,2 ± 0,4	0,36	1,8 ± 0,6	0,50
Porcentaje de materia seca/planta	21,2 ± 5,2	0,68	30,3 ± 6,9	0,67	18,5 ± 3,3	0,50	16,5 ± 2,5	0,16
Ancho de la raíz (cm)	11,3 ± 4,3	0,65	7,1 ± 2,5	0,62	11,5 ± 4,3	0,46	11,1 ± 4,7	0,16
Número de hojas por planta	31,4 ± 11,2	0,48	49,8 ± 8,1	0,67	27,0 ± 13,9	0,43	65,4 ± 23,5	0,50
Número de lóculos/vaina	7,7 ± 1,5	0,48	7,1 ± 0,6	0,48	9,3 ± 1,6	0,43	8,3 ± 1,4	0,50
Peso de la semilla/planta (g)	61,3 ± 58,9	0,53	10,3 ± 5,7	0,05	57,6 ± 36,9	0,43	97,7 ± 60,1	0,66
Número de semillas/vaina	6,9 ± 1,6	0,35	6,2 ± 0,7	0,38	8,9 ± 1,7	0,46	7,3 ± 1,5	0,50
Peso de la raíz/planta (g)	989,9 ± 721,8	0,45	522,5 ± 335,8	0,28	991,8 ± 926,1	0,43	2428,8 ± 2198,0	0,33
Ancho de la semilla (mm)	8,2 ± 0,6	0,51	8,2 ± 0,4	0,57	7,5 ± 0,6	0,00	9,2 ± 0,6	0,50
Longitud de la raíz (cm)	12,9 ± 4,1	0,38	17,5 ± 5,8	0,28	13,8 ± 4,9	0,64	18,4 ± 5,9	0,00
Días a la madurez fisiológica vaina	208,2 ± 16,9	0,45	287,0 ± 2,3	0,00	174,1 ± 24,1	0,54	238,7 ± 16,4	0,50
Longitud de la flor (mm)	24,1 ± 1,6	0,38	25,4 ± 0,9	0,49	21,3 ± 1,3	0,46	24,6 ± 1,3	0,00
Grados brix raíz	6,7 ± 0,8	0,51	7,5 ± 1,7	0,38	7,0 ± 0,7	0,18	6,1 ± 0,5	0,33
Ancho del foliolo principal (cm)	11,9 ± 2,5	0,47	6,6 ± 1,3	0,33	15,4 ± 3,7	0,43	13,3 ± 2,8	0,00
Número de inflorescencias/rama	7,5 ± 4,8	0,45	7,5 ± 2,0	0,76	18,1 ± 3,4	0,11	15,9 ± 5,0	0,00
Ancho del estandarte de la flor (mm)	19,8 ± 1,7	0,47	13,8 ± 0,7	0,28	17,8 ± 1,4	0,43	19,2 ± 1,3	0,00
Longitud del foliolo principal (cm)	10,2 ± 2,1	0,53	11,9 ± 2,3	0,19	11,8 ± 2,7	0,43	12,8 ± 2,2	0,00
Longitud de la semilla (mm)	11,2 ± 1,1	0,74	11,4 ± 0,5	0,19	10,6 ± 0,7	0,11	11,9 ± 0,8	0,00
Número nudos tallo principal (cm)	15,9 ± 8,9	0,42	26,1 ± 4,2	0,24	28,9 ± 9,8	0,46	31,7 ± 6,7	0,00

Pro = promedio; "D" = valor discriminante; "Dw" = valor discriminante ponderado

\* = número de entradas por grupo

Cuadro 13. Continuación...

CARÁCTER	G1 (12)		G2 (7)		G3 (8)		G4 (4)*	
	Pro.	"D"	Pro.	"D"	Pro.	"D"	Pro.	"D"
Longitud de la vaina (cm)	17,4 ± 2,8	0,54	18,8 ± 0,9	0,00	19,3 ± 3,8	0,43	19,8 ± 2,2	0,00
Ancho de la vaina (cm)	1,9 ± 0,2	0,54	2,0 ± 0,1	0,00	1,6 ± 0,1	0,43	2,6 ± 0,2	0,00
Relación largo/ancho de semilla	1,4 ± 0,1	0,44	1,4 ± 0,1	0,48	1,4 ± 0,1	0,14	1,3 ± 0,1	0,00
Longitud del tallo principal (cm)	156,5 ± 159,9	0,45	427,0 ± 68,4	0,05	63,8 ± 42,8	0,43	475,4 ± 106,7	0,00
Relación largo/ancho de vaina	9,1 ± 1,4	0,39	9,1 ± 0,3	0,00	11,7 ± 2,5	0,50	7,6 ± 1,0	0,00
Número de vainas/planta	17,8 ± 14,2	0,42	8,2 ± 3,9	0,28	16,4 ± 9,3	0,11	26,4 ± 15,7	0,00
Relación largo/ancho del foliolo	0,9 ± 0,1	0,48	1,8 ± 0,1	0,28	0,8 ± 0,1	0,00	1,0 ± 0,1	0,00
Número de botones/inflorescencia	18,8 ± 8,4	0,29	16,7 ± 4,1	0,14	8,6 ± 1,2	0,14	25,7 ± 8,6	0,50
Largo de los estambres	20,9 ± 1,9	0,24	23,3 ± 0,9	0,57	18,6 ± 1,4	0,04	21,3 ± 1,4	0,00
Número de raíces/planta	1,3 ± 0,6	0,30	1,1 ± 0,3	0,19	1,0 ± 0,2	0,25	2,4 ± 1,2	0,00
Grosor de la corteza de raíz (mm)	0,9 ± 0,4	0,24	1,2 ± 1,2	0,00	0,9 ± 0,3	0,21	0,8 ± 0,4	0,33
Número de días a la floración	86,7 ± 18,6	0,20	179,8 ± 22,4	0,00	73,4 ± 13,7	0,43	115,1 ± 29,2	0,00
Número de ramas/planta	2,3 ± 1,0	0,24	1,8 ± 0,5	0,05	1,1 ± 0,4	0,18	2,5 ± 0,9	0,00
Número de ramas/inflorescencia	2,2 ± 0,9	0,24	1,1 ± 0,2	0,00	1,1 ± 0,4	0,18	2,4 ± 0,9	0,00

Pro = promedio; "D" = valor discriminante; "Dw" = valor discriminante ponderado  
 \* = número de entradas por grupo

Dentro de todos los caracteres cuantitativos, la relación L/A de la raíz se consideró como el primer carácter con mayor poder discriminante (0,57) para separar entradas dentro de cada grupo. Además, se observa que los valores son relativamente más bajos que los caracteres cuantitativos que separan los grupos, indicando que existe menor variabilidad entre entradas para los caracteres cuantitativos (Cuadro 13). Una vez recalculados los  $D'w=Dw(1-r^2)$ , sobre la base del carácter con mayor valor discriminante (0,57), la relación L/A del foliolo principal de la hoja se eligió como el segundo carácter con mayor poder discriminante (0,47), seguido de días a la madurez fisiológica, días a la floración y largo de los estambres con valores de 0,41; 0,40 y 0,34, respectivamente.

Al ubicar los resultados separados de acuerdo con la parte de la planta (Cuadro 14) se observa que en los caracteres de la flor y de la hoja, los individuos del G3 y G4 tuvieron los menores promedios de "D" con 0,24 y 0,06 para la flor; y , 0,32 y 0,12 para la hoja, respectivamente; ubicándose las entradas del G1 con el mayor promedio (0,31 y 0,49). En lo que respecta a los caracteres del tallo se identificó que la longitud y el número de nudos son totalmente similares en las entradas que conforman el G4 con 0,0 de valor discriminante, en cambio el G3 presentó el valor "D" promedio más alto con 0,44.

Los caracteres de la raíz fueron los más disimiles entre las entradas del G4. Nuevamente en las entradas del G1, los caracteres de la raíz fueron los que tuvieron los más altos promedios de "D" con 0,48. Por último, los individuos que conforman el G2 y G4 no presentan diferencias morfológicas en los promedios de los caracteres de la vaina (0,12 y 0,16 respectivamente), pero si los del G1 con un valor de 0,47.

El valor Dw ponderado indica que los caracteres de la raíz fueron los que más aportan en la diferenciación de las entradas con un valor de 0,40 y los caracteres que menos aportan son los de la flor con 0,26 (Cuadro 14).

**Cuadro 14.** Promedio del valor discriminante "D" y "Dw" para los caracteres cuantitativos de flor, tallo, hoja, vaina, semilla y raíz, en el agrupamiento de entradas de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

PARTE DE LA PLANTA	VALOR "D"				VALOR "Dw"
	GRUPO 1 (ashipas)	GRUPO 2 (chuines)	GRUPO 3 (jíquimas)	GRUPO 4 (ashipas)	
Flor	0,31	0,28	0,24	0,06	0,26
Tallo	0,43	0,14	0,44	0,00	0,31
Hoja	0,49	0,36	0,32	0,12	0,37
Vaina	0,47	0,12	0,40	0,16	0,34
Semilla	0,51	0,33	0,23	0,33	0,37
Raíz	0,48	0,38	0,37	0,23	0,40

#### 4.1.2.5. Clasificación de los grupos

Los descriptores o caracteres cualitativos están constituidos por varios estados que expresan la variabilidad de la colección. La relación de los agrupamientos con los estados de los caracteres de mayor poder discriminante permite comprender con facilidad la naturaleza de los agrupamientos (Cuadro 15). A continuación se describen las características más distintivas.

##### 4.1.2.5.1. Forma del lóbulo central del foliolo principal de la hoja

Este carácter con el mayor valor discriminante para el agrupamiento de la colección, indica que los grupos de ashipas 1 y 4 son similares con un 83,4 y 100%, respectivamente de ausencia de lóbulos, es decir, con un foliolo entero; así mismo, el grupo de chuines se diferencia de todos los demás para este carácter por presentar 7 entradas con un lóbulo oblongo en un 100%. El grupo de jíquimas presentó en un 75% de las entradas un lóbulo lanceolado y en un 25% romboide (Fig 4). Además, se puede observar en la Fig. 5 las diferentes formas del lóbulo del foliolo central de la colección de la especie en estudio

**Cuadro 15.** Frecuencias de las accesiones de la colección de *P. tuberosus* según el estado de los caracteres cualitativos con mayor poder discriminante entre los agrupamientos jerárquicos de Ward. CATIE, 1998.

CARACTER	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	Total Accesiones (%)
<b>Forma del lóbulo central del foliolo principal</b>					
0 ausente	10 (83,4)	---	---	4 (100,0)	14 (45,2)
1 romboide	1 (8,3)	---	2 (25,0)	---	3 (9,7)
3 oblongo	1 (8,3)	7 (100,0)	---	---	8 (25,8)
5 oblongo lanceolado	---	---	---	---	---
7 lanceolado	---	---	6 (75,0)	---	6 (19,3)
<b>Tipo de lóbulos en el foliolo central de la hoja</b>					
0 ausente	10 (83,4)	---	---	4 (100,0)	14 (45,2)
1 muy superficial	1 (8,3)	---	2 (25,0)	---	3 (9,7)
3 superficiales	1 (8,3)	7 (100,0)	---	---	8 (25,8)
5 moderados	---	---	---	---	---
7 profundos	---	---	6 (75,0)	---	6 (19,3)
9 muy profundos	---	---	---	---	---
<b>Color de la pulpa de la raíz</b>					
1 amarillo imperial	---	---	---	2 (50,0)	2 (6,5)
2 amarillo mimosa	---	1 (14,4)	---	---	1 (3,2)
3 amarillo pajizo	---	3 (42,8)	---	2 (50,0)	5 (16,1)
4 blanco	12 (100,0)	---	8 (100,0)	---	20 (64,5)
5 blanco + morado	---	3 (42,8)	---	---	3 (9,7)
<b>Forma de la semilla</b>					
1 aplanada	1 (8,3)	7 (100,0)	---	---	8 (25,8)
6 dentada	---	---	---	---	---
7 redondeada	8 (66,7)	---	8 (100,0)	---	16 (51,6)
8 cilíndrica	---	---	---	---	---
9 semiaplanada	3 (25,0)	---	---	4 (100,0)	7 (22,6)
<b>Velocidad de crecimiento del tallo principal</b>					
1 muy lento	---	---	---	---	---
3 lento	---	7 (100,0)	1 (12,5)	---	8 (25,8)
5 intermedio	8 (66,7)	---	7 (87,5)	---	15 (48,4)
7 rápido	---	---	---	---	---
9 muy rápido	4 (33,3)	---	---	4 (100,0)	8 (25,8)

Cuadro 15. Continuación.....

CARACTER	G1 (%)	G2 (%)	G3 (%)	G4 (%)	Total Accesiones (%)
Color de los sépalos de la flor					
1 amarillo sulfhur	1 (8,3)	---	---	---	1 (3,2)
2 marrón	9 (75,0)	---	3 (37,5)	---	12 (38,7)
3 verde chicharo	---	7 (100,0)	---	4 (100,0)	11 (35,5)
4 violeta victoria	2 (16,7)	---	5 (62,5)	---	7 (22,6)
Color del tallo					
1 verde lechuga	12 (100,0)	---	6 (75,0)	4 (100,0)	22 (71,0)
2 verde lechuga + morado	---	---	2 (25,0)	---	2 (6,4)
3 verde oscuro	---	7 (100,0)	---	---	7 (22,6)
Hábito de crecimiento					
3 arbustivo	1 (8,3)	---	6 (75,0)	---	7 (22,6)
5 semiarbustivo	3 (25,0)	---	2 (25,0)	---	5 (16,1)
7 semitrepador	5 (41,7)	1 (14,3)	---	---	6 (19,4)
9 trepador	3 (25,0)	6 (85,7)	---	4 (100,0)	13 (41,9)
Curvatura de la vaina					
1 recta	8 (66,7)	7 (100,0)	---	4 (100,0)	19 (61,3)
3 ligeramente curvada	4 (33,3)	---	1 (12,5)	---	5 (16,1)
5 medianamente curvada	---	---	4 (50,0)	---	4 (12,9)
7 la mayor parte curvada	---	---	3 (37,5)	---	3 (9,7)
Color de la vaina inmadura					
1 verde lechuga	12 (100,0)	7 (100,0)	---	4 (100,0)	23 (74,2)
2 verde chícharo	---	---	8 (100,0)	---	8 (25,8)

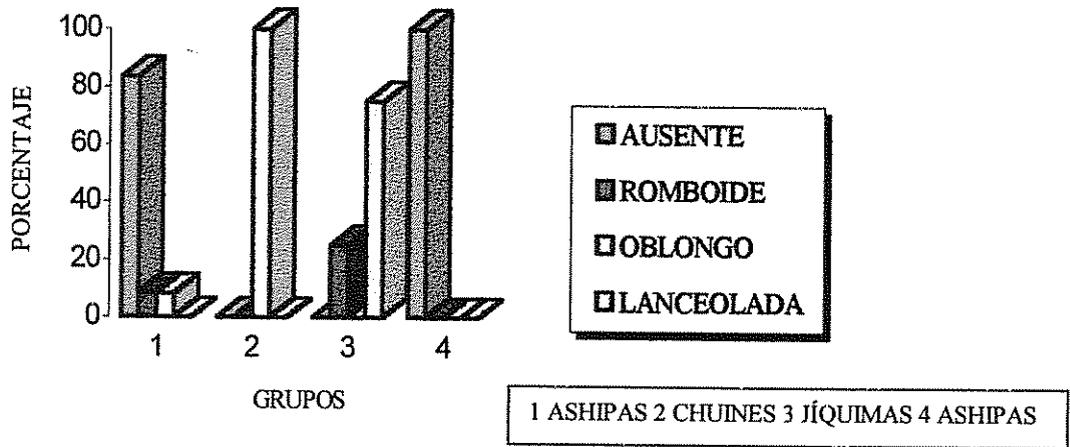


Fig. 4. Forma del lóbulo en el foliolo principal de la hoja de cuatro grupos de genotipos de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

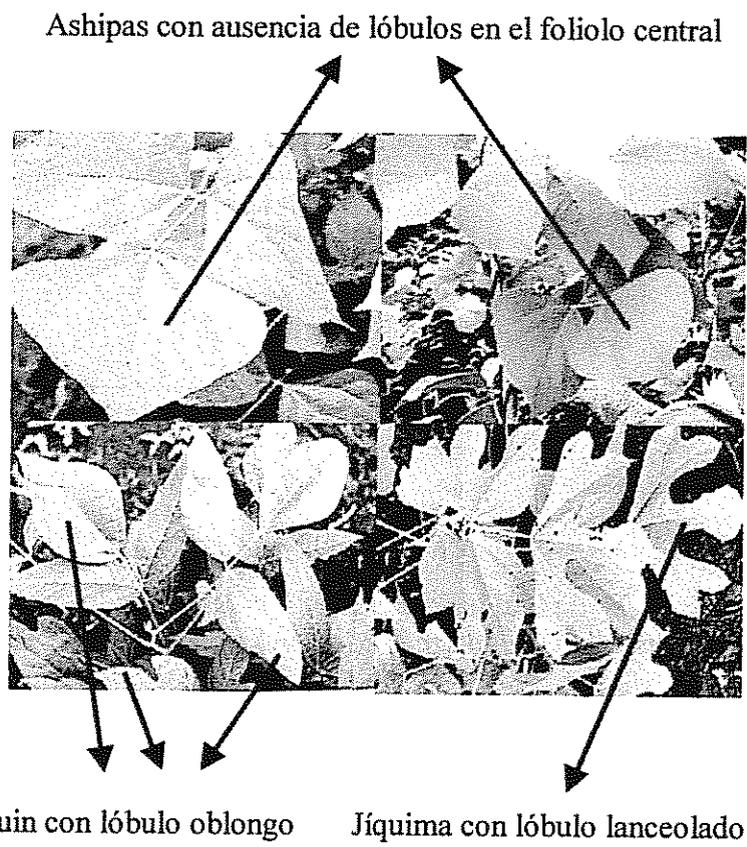
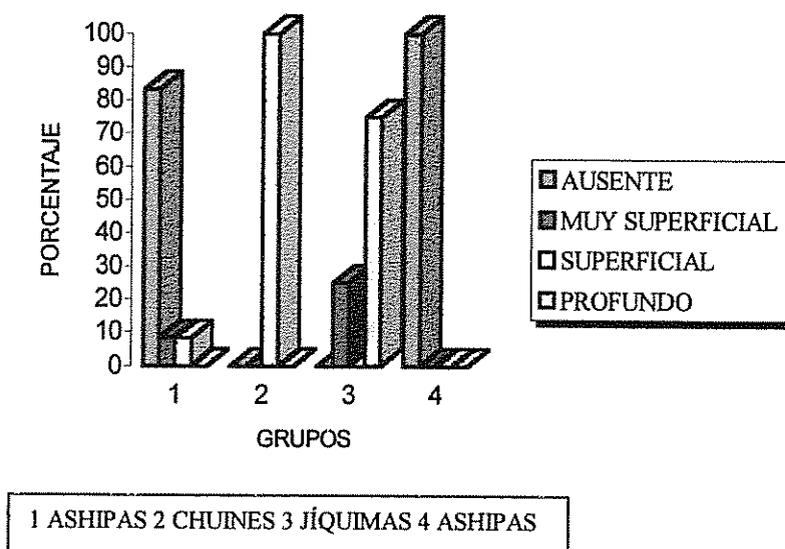


Fig. 5. Forma típica del lóbulo del foliolo central de la hoja en jíquimas, ashipas y chuines de la colección de *P. tuberosus* del CATIE, 1998

#### 4.1.2.5.2. Tipo de lóbulos en el foliolo principal de la hoja

Los grupos G1 y G4 presentaron ausencia de lóbulos, en cambio, que en el G2 se observó lóbulos superficiales en un 100% de las entradas; y, en el G3, lóbulos profundos en el 75%, y muy superficiales en un 25% (Fig 6 y Cuadro 15).



**Fig. 6.** Tipo del lóbulo en el foliolo principal de la hoja de cuatro grupos de genotipos de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.3. Color de la pulpa de la raíz

El color de la pulpa de la raíz tuberosa muestra que existe mucha similitud entre los G1 y G3. En la Fig. 7 se aprecia además, que el G2 es el de mayor variabilidad ya que 3 entradas fueron blanco con morado, 3 de color amarillo pajizo y 1 de amarillo mimosa. Por último, el 50% de los genotipos del G4, presentaron un color amarillo imperial y el otro 50% un color amarillo pajizo (Cuadro 15).

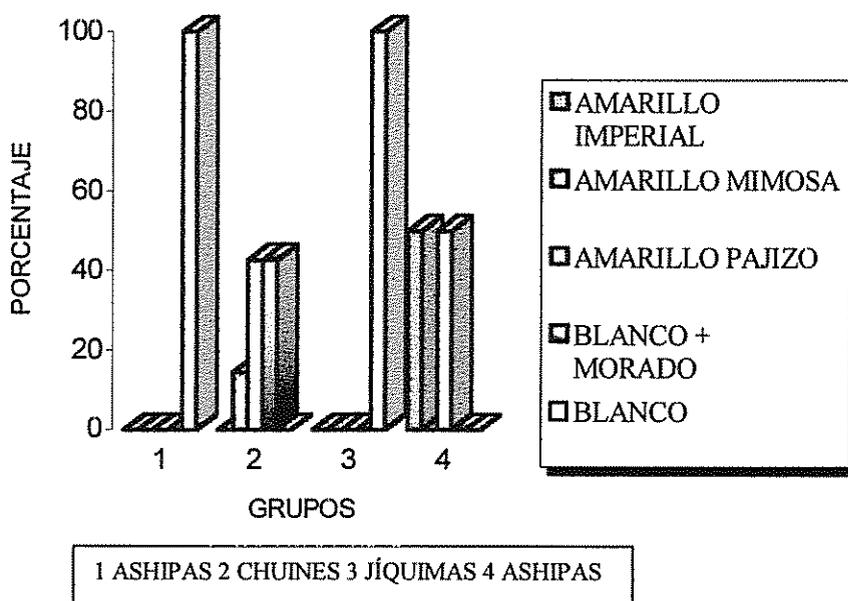


Fig. 7. Color de la pulpa de la raíz de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.4. Forma de la semilla

En la Fig. 8 se observa que el G1 es el más heterogéneo, presentando 8 entradas con semilla redondeada, 3 con forma semiaplanada y 1 entrada con semilla aplanada. Los demás grupos se distinguieron por presentar un 100% de las entradas con una forma determinada, es así, como el G2 presentó semilla aplanada, el G3 forma redondeada y el G4 semilla semiaplanada (Cuadro 15).

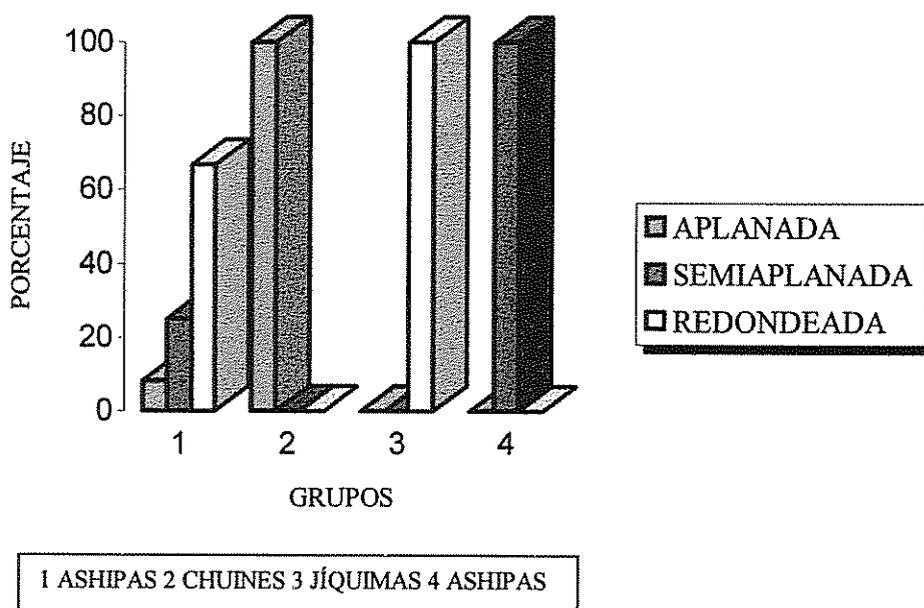


Fig. 8. Forma de la semilla de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.5. Velocidad de crecimiento del tallo principal

El G2 presentó en 100% de las entradas una lenta velocidad de crecimiento del tallo principal; al contrario, en el G4 se observó un crecimiento del tallo muy rápido. El G1 presentó un 66,7% con un crecimiento intermedio y el 33,3% muy rápido. Las entradas del G3 tuvieron un crecimiento intermedio en un 87,5% (7 entradas) y solamente el 12,5% (1 entrada) con una velocidad lenta (Fig. 9 y Cuadro 15).

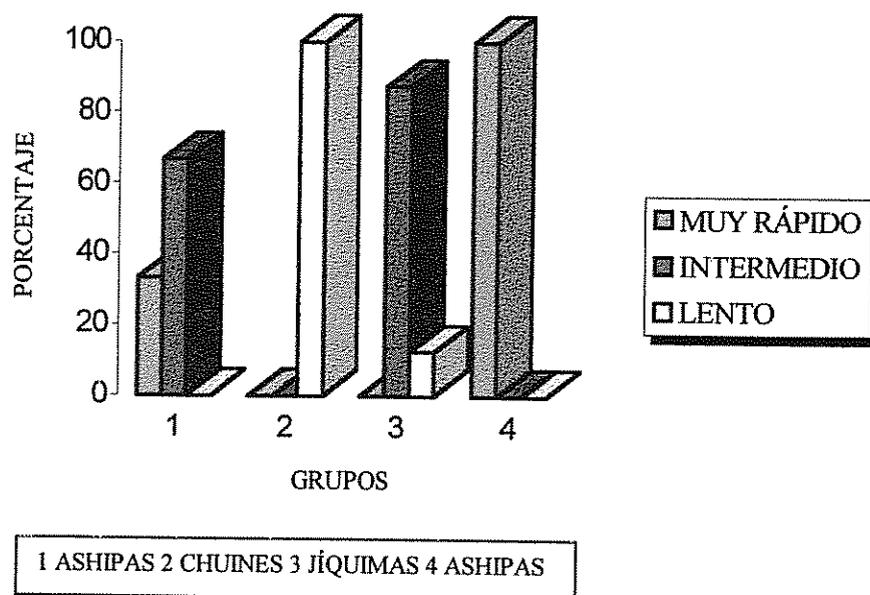


Fig. 9. Velocidad de crecimiento del tallo principal de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.6. Color de los sépalos de la flor

Los grupos más homogéneos o con ninguna variabilidad para el color de los sépalos fueron los G2 y G4, siendo además similares entre ellos con un color verde chicharo. El G1 fue el más heterogéneo presentando 1 entrada amarillo sulfhur, 9 de color marrón y 2 entradas de violeta victoria. Por último en la Fig. 10 se observa que el G3 presentó 62,5% de las entradas con un color violeta victoria y 37,5% marrón, (Cuadro 15).

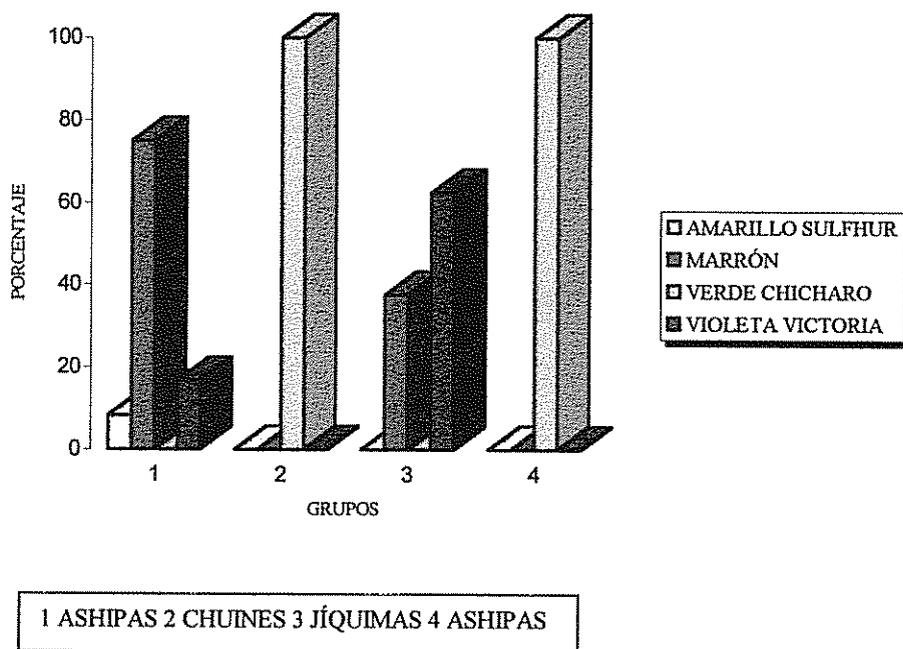


Fig. 10. Color de los sépalos de la flor de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.7. Color del tallo

Existió un predominio muy marcado del color verde lechuga en los G1, G3 y G4 de la colección. En los grupos de ashipas este color se dio en el 100% de las entradas, en cambio, en el grupo de jíquimas, el 75% presentó este color y un 25% un color verde lechuga con morado. Al igual que para otros caracteres, el grupo de chuines se separó de los demás por presentar un color verde oscuro en el 100% de las entradas (Fig. 11 y Cuadro 15).

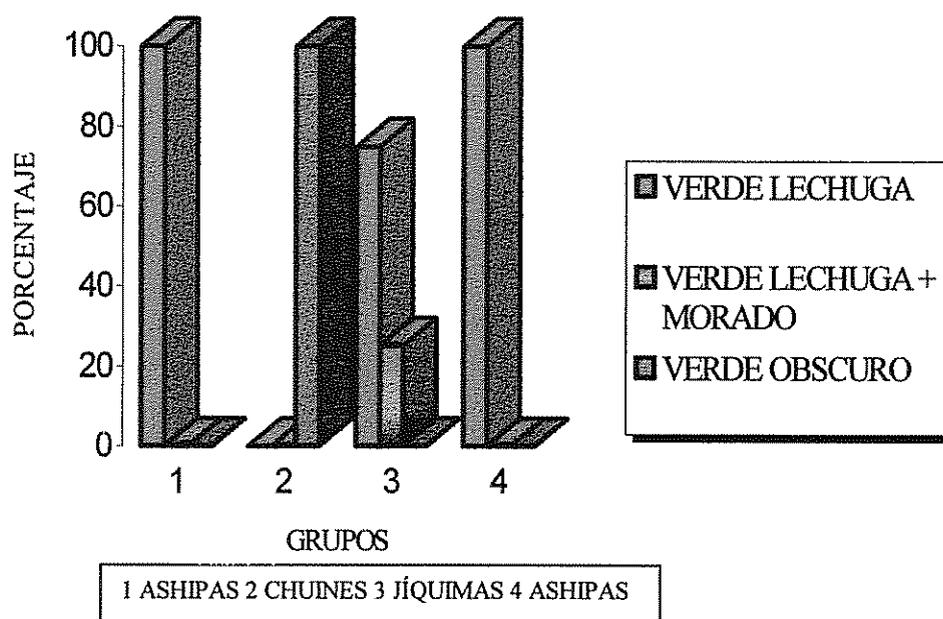


Fig. 11. Color del tallo de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.8. Hábito de crecimiento

En la Fig. 12 se puede observar que el G1 es el más heterogéneo por presentar cuatro hábitos de crecimiento: 1 entrada con hábito arbustivo, 3 con semiarbustivo, 5 con semitrepador y 3 con hábito trepador. El G2 presentó en el 85,7% de las entradas, hábito trepador y solamente en un 14,3%, semitrepador. El G3 tiene 6 entradas con hábito arbustivo (75%) y 2 con semiarbustivo (25%). El G4 fue el más homogéneo con un hábito totalmente trepador (Cuadro 15).

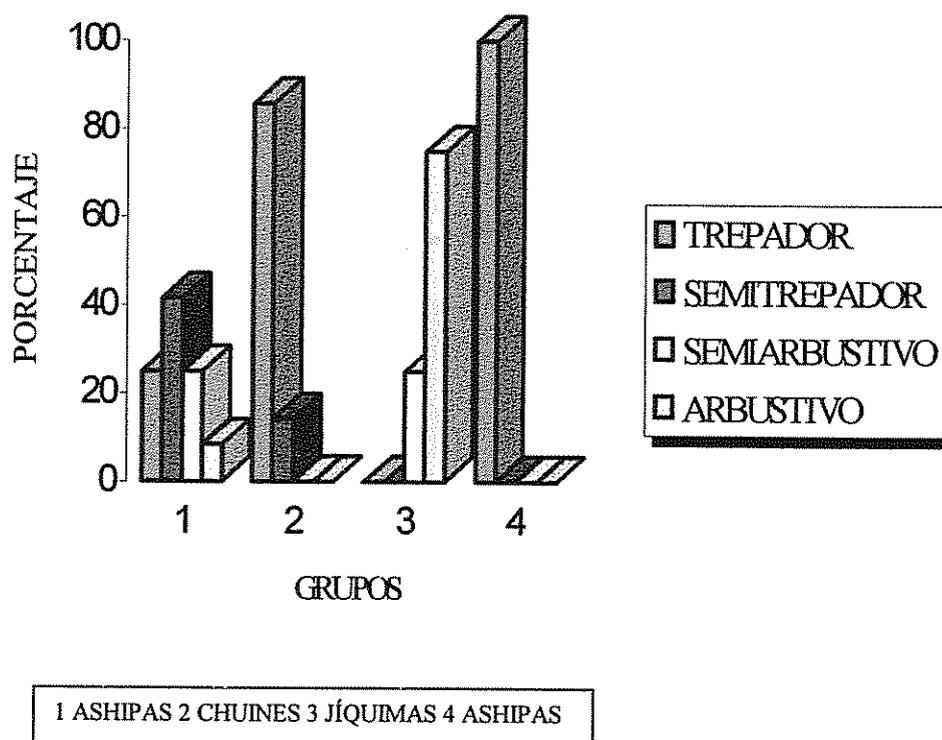
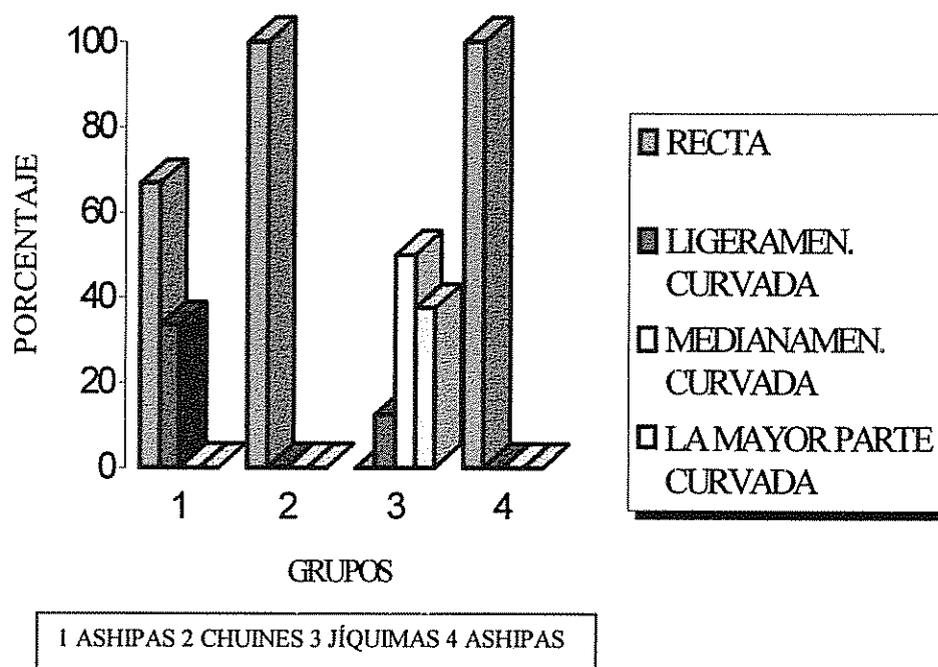


Fig. 12. Hábito de crecimiento de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.9. Curvatura de la vaina

Se pudo notar que los G1 (66,7%), G2 (100%) y G4 (100%) presentan una curvatura de vaina recta y solamente el 33,3% del G1 es ligeramente curvada (Fig. 13). El G3 es el más heterogéneo con tres tipos de curvaturas: la mayor parte curvada (37,5%), medianamente curvada (50%) y ligeramente curvada (12,5%) (Cuadro 15).



**Fig. 13.** Curvatura de la vaina de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.5.10. Color de la vaina inmadura

En la Fig. 14 se observan los grupos (ashipas y chuines) con un 100% de vainas inmaduras con color verde lechuga. Diferenciándose de los grupos antes mencionados está el grupo de jíquimas con un color verde chicharo en su totalidad (Cuadro 15).

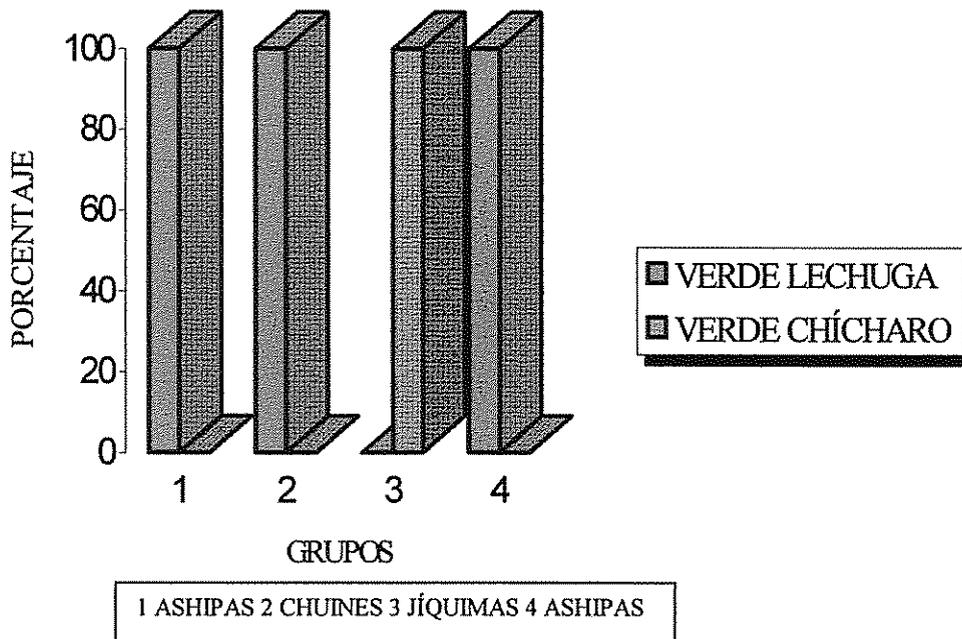


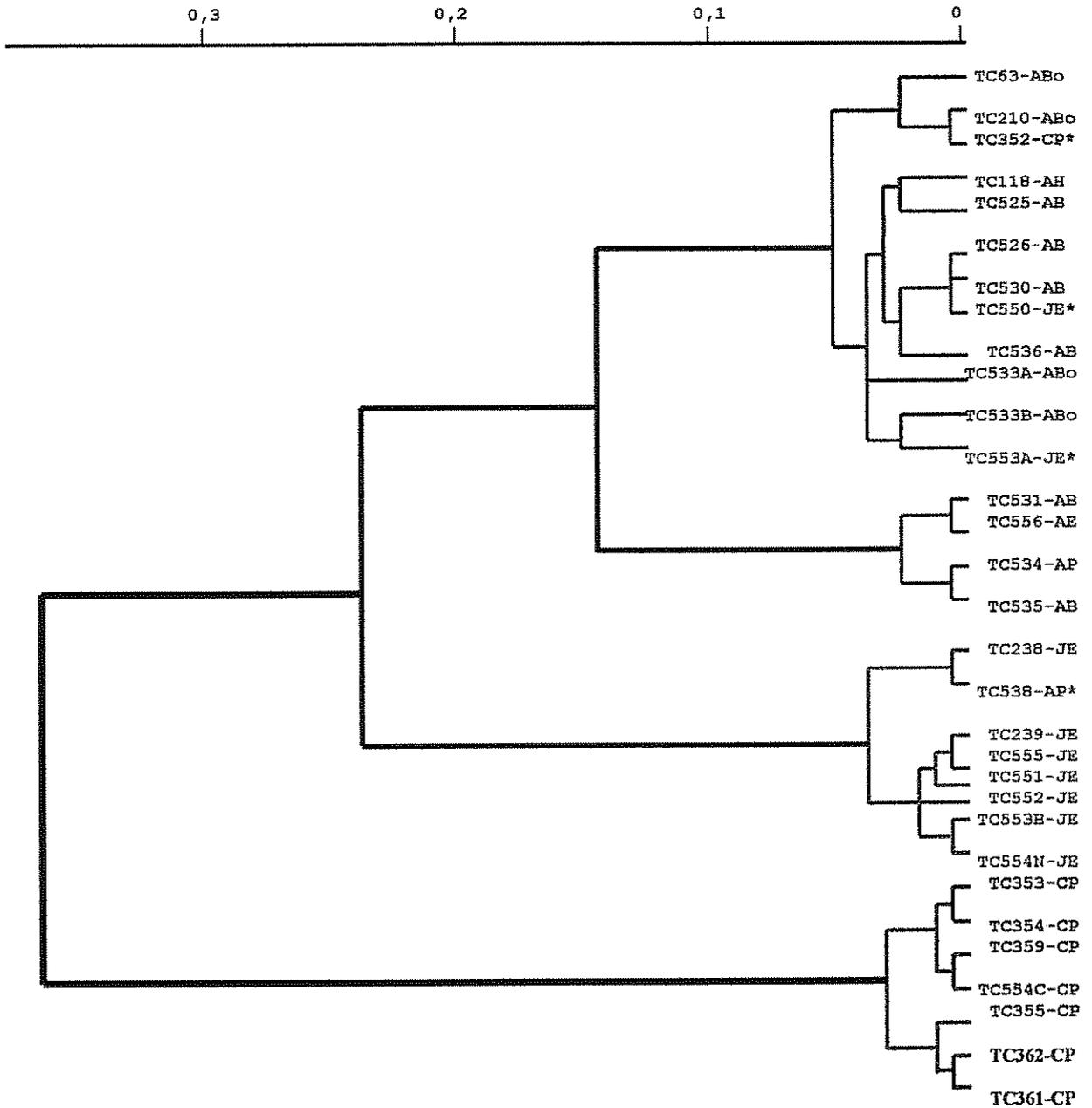
Fig. 14. Color de la vaina inmadura de cuatro grupos de genotipos. de *P. tuberosus* evaluados en Turrialba, Costa Rica. CATIE, 1998.

#### 4.1.2.6. Estructura de los agrupamientos

La estructura taxonómica obtenida por la matriz de distancia con el agrupamiento jerárquico de Ward (1963), se representa gráficamente por medio de un fenograma (Fig. 15) para mostrar la relación en grado de disimilitud entre entradas o grupo de las mismas. Esta relación determina en cierta medida el parentesco genético entre entradas y la variabilidad observada en cada agrupamiento. El fenograma muestra cuatro grupos de individuos de acuerdo a la clasificación morfoetnobotánica hecha por Sørensen (1996), es decir, chuines (grupo 2), ashipas (grupo 1 y 4) y jíquimas (grupo 3). Con un asterisco se señalan los genotipos que no coinciden con el grupo respectivo. En el grupo de las ashipas hay tres entradas y una en el grupo de las jíquimas. Las entradas son: TC553A (jíquima), TC550 (jíquima), TC352 (chuin), TC538 (ashipa), que morfoagronómicamente son similares a las ashipas a excepción de la TC538 que es similar a las jíquimas.

La Fig. 16 representa la ubicación espacial de los individuos de acuerdo a las ecuaciones construidas a partir del coeficiente de Gower (1967) en cada uno de las 31 entradas mediante el análisis discriminante canónico. La variable canónica CAN1 explica el 99% de la variabilidad total y separa el grupo de los chuines y jíquimas de los demás grupos, mientras que la variable canónica CAN2 que explica el 1% de la variabilidad, separa los grupos de las ashipas de los otros dos. Además, se observa que las mayores distancias se presentaron entre los grupos de ashipas con el grupo de chuines (4250 y 3877 respectivamente). Por el contrario, los grupos más relacionados evidentemente fueron los dos grupos de ashipas con una distancia de 394.

En el Cuadro 16 se observa los caracteres cualitativos y cuantitativos que son compartidos o no por los subgrupos que se formaron en los cuatro grandes agrupamientos. Se observa que el grupo de los chuines y el G4 comparten y se diferencian en los mismos caracteres.



\* entradas que no corresponde su morfología a los datos pasaporte

- = grupo 1
- = grupo 4
- = grupo 3
- = grupo 2

A = ashípa; C = chuín; J = jíquima      Bo=Bolivia; P=Perú; H=Haití; B=Brasil; E=Ecuador

**Fig. 15.** Fenograma obtenido por el agrupamiento jerárquico de Ward de la colección de *P. tuberosus* basado en distancias de Gower (1967). CATIE, 1998

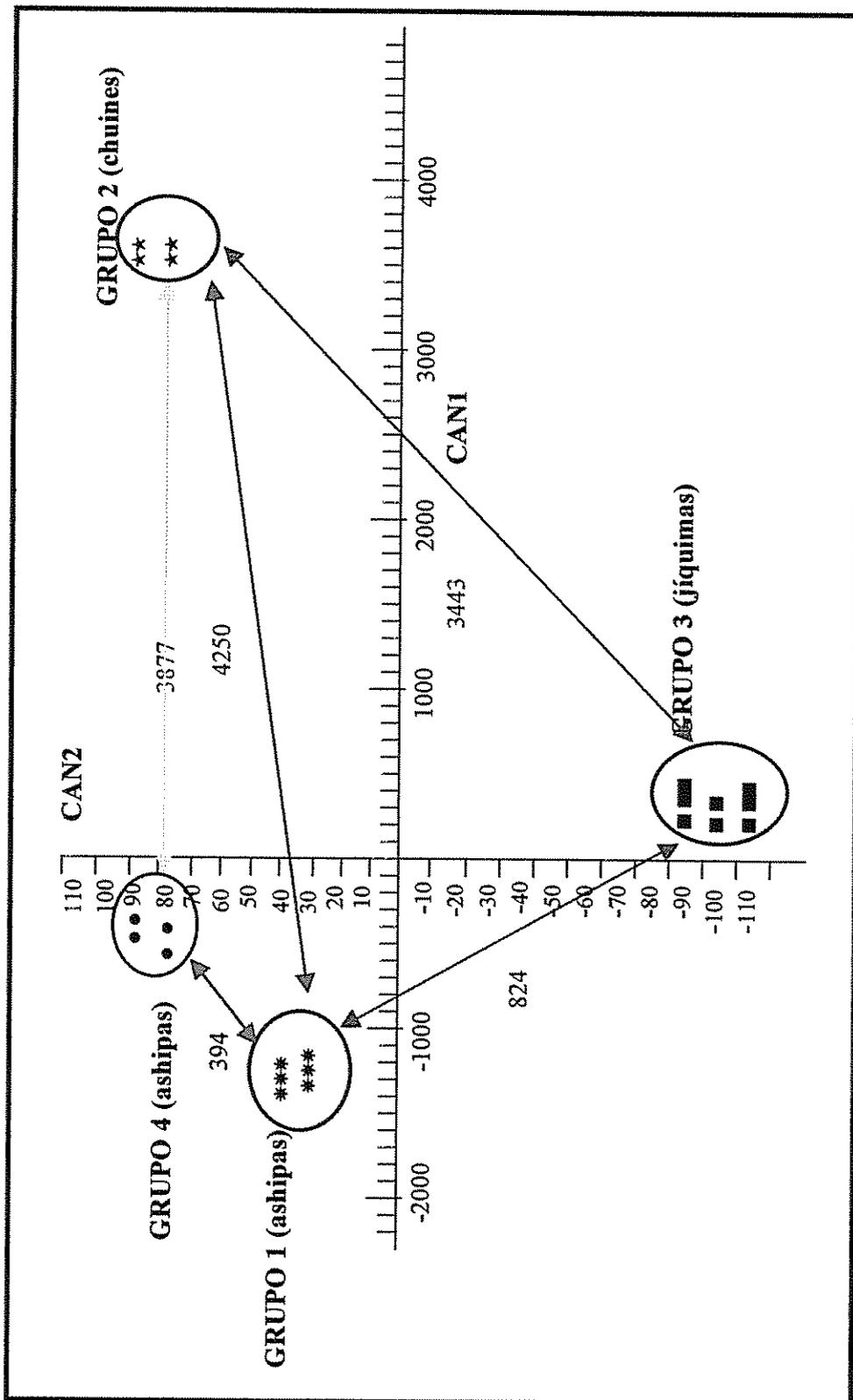


Fig. 16. Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower (1967). CATIE, 1998.

**Cuadro 16.** Caracteres cualitativos y cuantitativos similares y diferentes dentro de los cuatro grupos conformados de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

GRUPOS	CARACTERES	
	COMPARTIBLES	NO COMPARTIBLES
GRUPO 1 (ASHIPAS)	Color de la pulpa de la raíz Color del tallo Color de la vaina inmadura	Forma y tipo de lóbulo, forma de semilla, velocidad de crecimiento, color sépalos, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, días floración y madurez fisiológica, ancho y L/A foliolo y ancho de vaina.
GRUPO 2 (CHUINES)	Forma y tipo de lóbulo, forma de semilla, velocidad de crecimiento, color sépalos, color del tallo, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, color de vaina inmadura, L/A foliolo y ancho de la vaina	Color de la pulpa Días floración Días madurez fisiológica Ancho del foliolo
GRUPO 3 (JÍQUIMAS)	Color de la pulpa Forma de la semilla Velocidad crecimiento tallo Color vaina inmadura L/A foliolo	Forma y tipo de lóbulo, color sépalos, color del tallo, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, días a la floración y madurez fisiológica, ancho del foliolo y ancho de la vaina
GRUPO 4 (ASHIPAS)	Forma y tipo de lóbulo, forma de semilla, velocidad de crecimiento, color sépalos, color del tallo, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, color de vaina inmadura, L/A foliolo y ancho de la vaina	Color de la pulpa Días floración Días madurez fisiológica Ancho del foliolo

El fenograma de la Fig. 15 se separó en pequeños fenogramas según los cuatro grupos característicos que se diferenciaron en la colección. El fenograma de la Fig. 17 muestra que el agrupamiento 1 representa principalmente a las entradas denominadas ashipas que se cultivan en Brasil y Bolivia. Excepción a estas, son dos introducciones de Ecuador, una de Perú y una de Haití, (TC550, TC553A, TC352 y TC118, respectivamente). La entrada TC118 se multiplicó en Haití pero su origen es desconocido.

En el agrupamiento 1 de las ashipas se observaron cuatro subgrupos. Con base en el Anexo 4 y 7 se establece que las entradas del subgrupo A (Fig. 17) se diferencian de los otros subgrupos en mayor velocidad de crecimiento del tallo y hábito de crecimiento trepador. El subgrupo B se diferencia de los demás subgrupos por presentar forma y tipo del lóbulo central del foliolo romboide u oblongo superficial o muy superficial y una floración y días a la madurez fisiológica más tardía. El subgrupo C presenta ausencia de lóbulos, color de la pulpa de la raíz blanca, forma de la semilla redondeada y en la TC536 semiaplanada; velocidad intermedia de crecimiento del tallo, sépalos color marrón. Se diferencia de los demás grupos por presentar un hábito de crecimiento semitrepador. El subgrupo D se caracteriza por presentar una vaina ligeramente curvada al contrario de los demás, que tienen una vaina recta. Además, junto con el subgrupo B tienen un ancho pequeño de vaina.

El agrupamiento 2 (Fig 18) contiene entradas originarias exclusivamente de las orillas del río Ucayali en la amazonia peruana. Se detecta dos subgrupos conformados por cuatro y tres entradas respectivamente. El carácter cualitativo de mayor poder discriminante entre estos subgrupos (Anexo 5 y 8) es el color de la pulpa: amarillo pajizo en A y blanco con líneas moradas en B. Los demás caracteres son similares: lóbulos lanceolados superficiales, semilla aplanada, lenta velocidad de crecimiento del tallo, sépalos de color verde chicharo, tallo verde oscuro, hábito de crecimiento trepador, vaina inmadura de color verde lechuga, días a la floración y madurez fisiológica tardía.

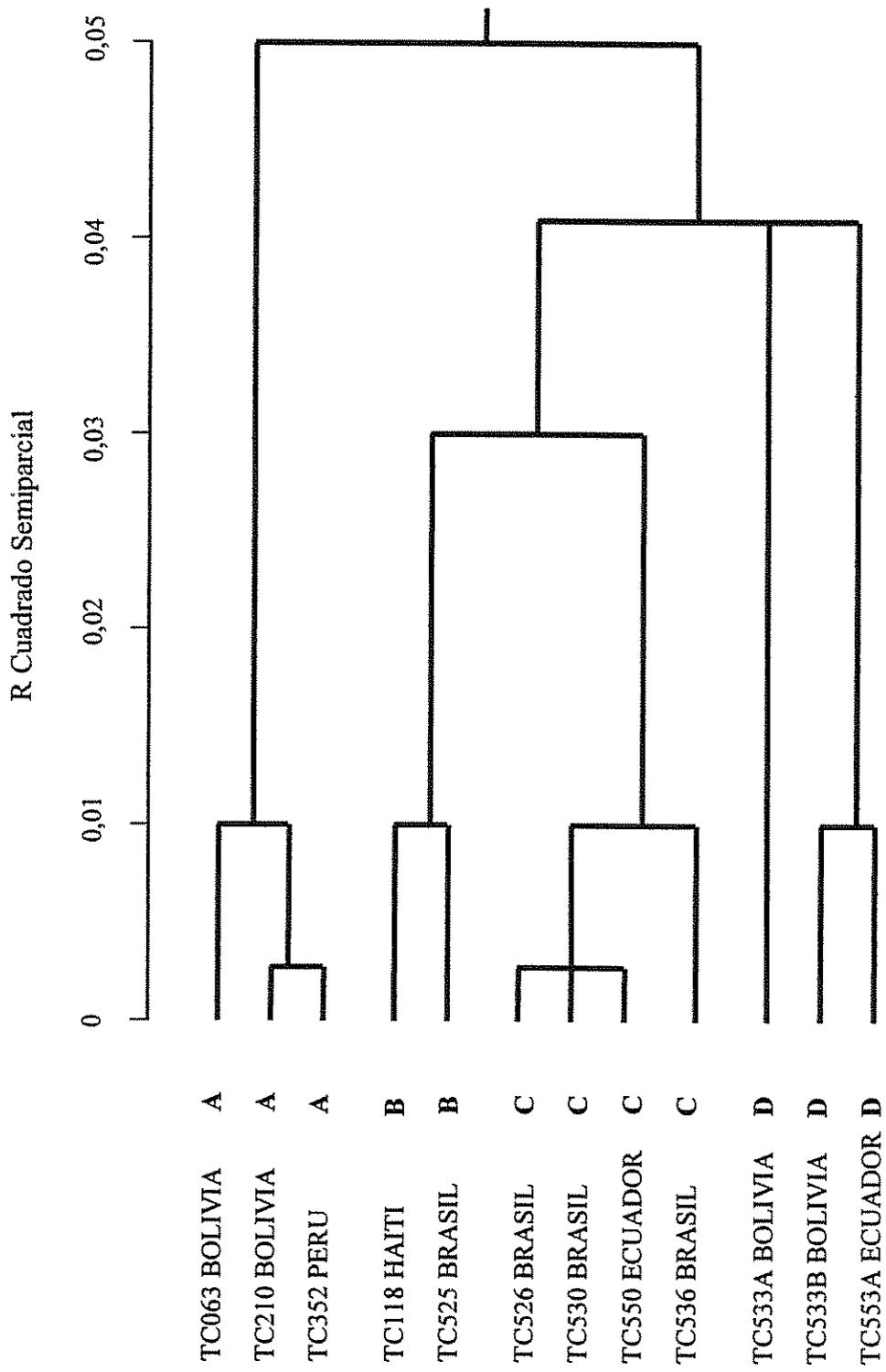


Fig. 17. Fenograma de 12 entradas de *P. tuberosus* en el agrupamiento 1 (ashipas). CATIE, 1998

R Cuadrado Semiparcial

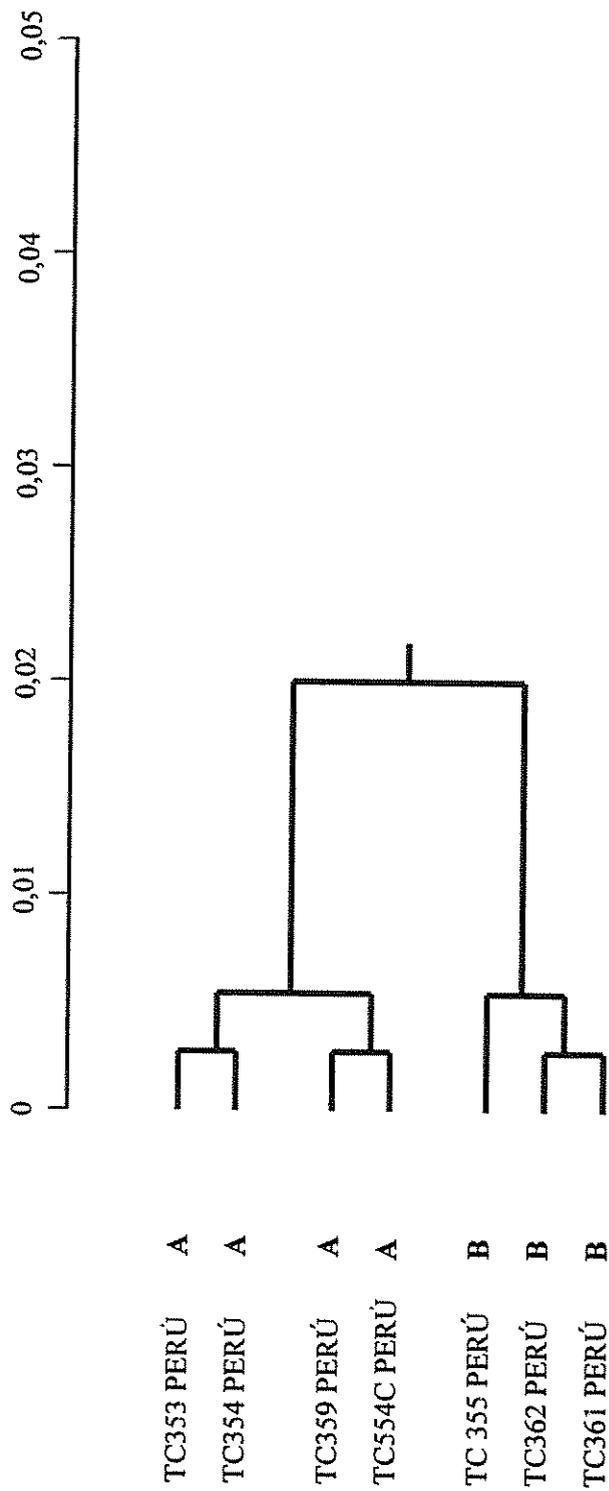


Fig. 18. Fenograma de 7 entradas de *P. tuberosus* en el agrupamiento 2 (chuines). CATIE, 1998

El agrupamiento 3 se formó con materiales provenientes de la costa pacífica de Ecuador y presentan dos subgrupos (Fig. 19). El subgrupo A se caracteriza por los siguientes caracteres cualitativos: forma y tipo del lóbulo oblongo muy superficial, tallo verde lechuga con rayas moradas, velocidad de crecimiento del tallo intermedio, floración y madurez fisiológica de la vaina tardía. El subgrupo B presentó una floración y madurez fisiológica más precoz, forma y tipo de lóbulo oblongo-lanceolado profundo; tallo de color verde lechuga y un crecimiento lento del tallo principal (Anexos 5 y 8). Al igual que en el agrupamiento 1, se agrupó un genotipo clasificado como ashipa (TC538) dentro de las jíquimas, lo que indica que existió otra "mutación de etiqueta" o equivocación en la rotulación del genotipo.

El agrupamiento 4 corresponde al igual que el 1 al grupo de las ashipas, con materiales de Brasil, Ecuador y Perú. A pesar de conformar el grupo solamente cuatro entradas se observa una distribución geográfica más amplia y esto es posiblemente debido al transporte de semilla a lo largo de los ríos de la Amazonia ecuatoriana y peruana que van a confluir en el río Amazonas en Brasil. Se identifica un gran parecido entre los dos subgrupos que se conformó mediante el fenograma (Fig. 20) y cuya diferencia radica exclusivamente en el número de días a la floración que es menor en el subgrupo A. En general, los dos subgrupos se caracterizan por tener un foliolo entero, pulpa de color amarillo imperial y pajizo, semilla semiaplanada, muy rápido crecimiento del tallo, sépalos de color verde chicharo, hábito trepador, vaina recta y muy ancha y madurez fisiológica de la vaina muy tardía (Anexo 6 y 9).

R Cuadrado Semiparcial

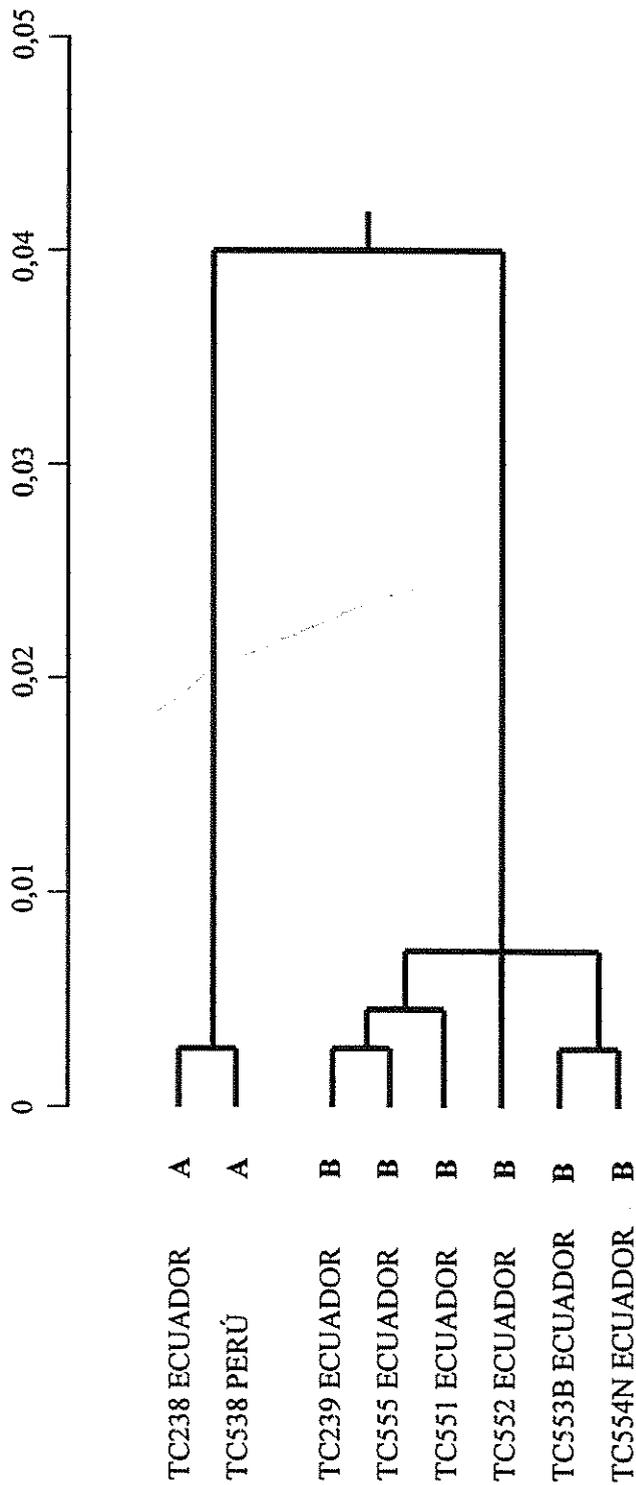


Fig. 19. Fenograma de 8 entradas de *P. tuberosus* en el agrupamiento 3 (jíquimas). CATIE, 1998

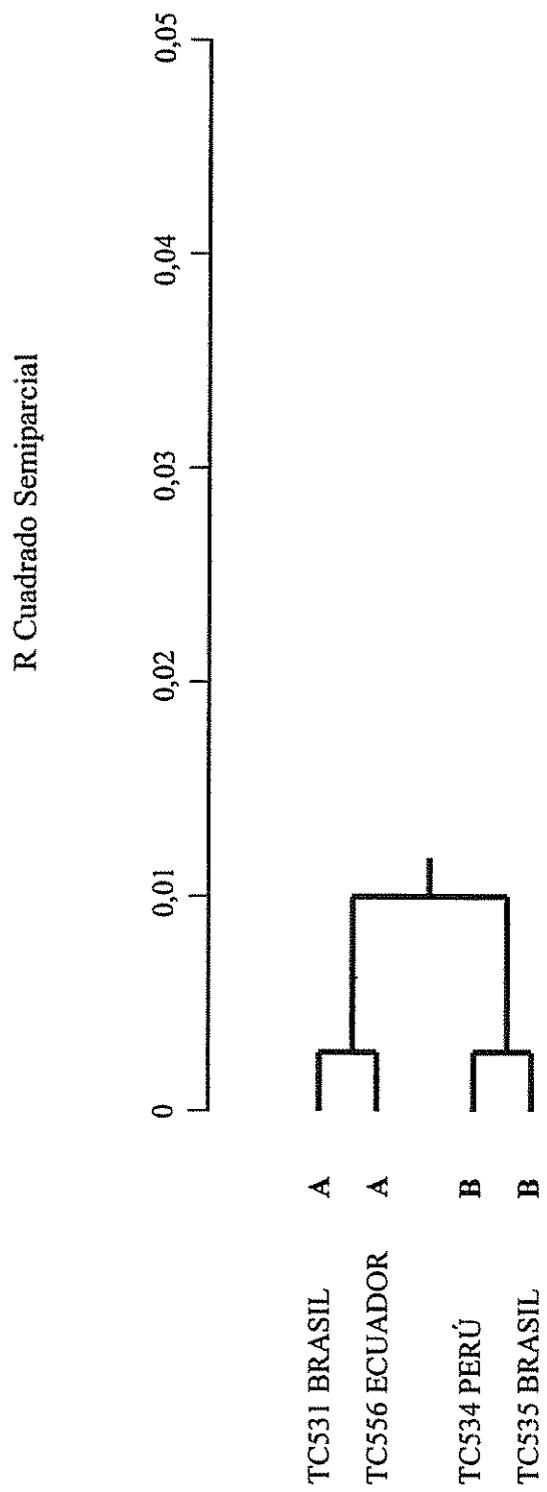


Fig. 20. Fenograma de 4 entradas de *P. tuberosus* en el agrupamiento 4 (ashipas). CATIE, 1998

## 4.2.FASE DE LABORATORIO

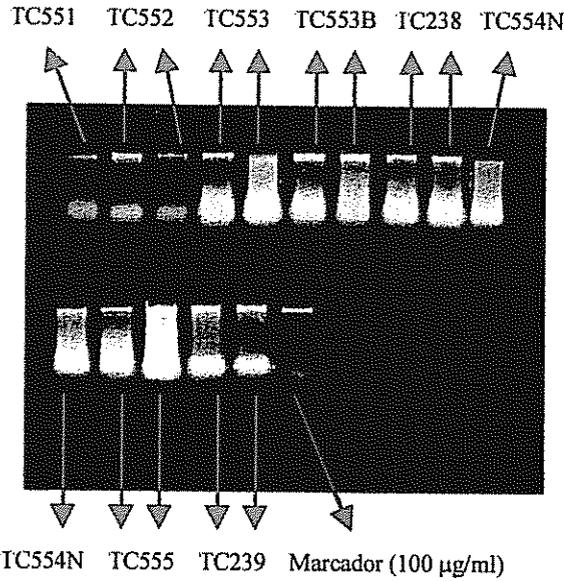
### 4.2.1 Aislamiento y determinación de la concentración de ADN

En la presente investigación se encontró que usando el método mini-CTAB, para una extracción suficiente de ADN, el más adecuado fue un peso de muestra inicial de 0,25 a 0,30 g a partir de hojas jóvenes (hojas de 5 o 6 días de haber brotado), pues, produjo cantidades suficientes de ADN. Hubo genotipos en que los rendimientos obtenidos de ADN fueron bajos, en tanto, que en otros genotipos fueron altos.

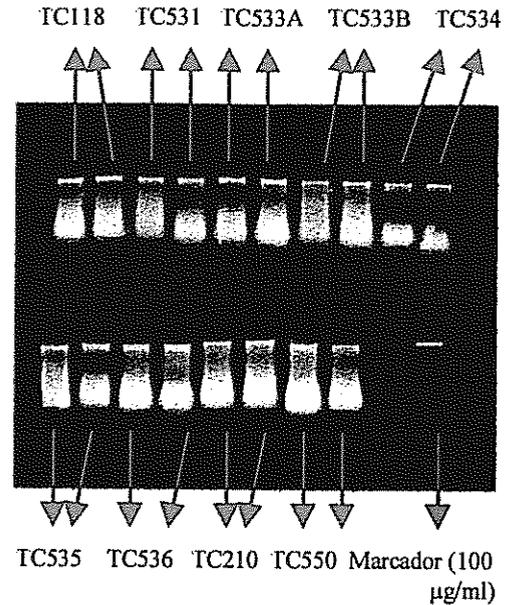
La intensidad en la maceración influye notablemente en la cantidad de ADN extraído, por lo tanto, una pulverización total de la muestra con nitrógeno líquido en un mortero produce los mejores resultados obteniéndose cantidades adecuadas de ADN.

Las muestras extraídas de las 31 entradas presentaron contaminación de ARN y carbohidratos (Figura 21, 22 y 23) los cuales no fueron eliminados por alguna técnica de purificación ya que se observó que dicha contaminación no influye en la amplificación del ADN.

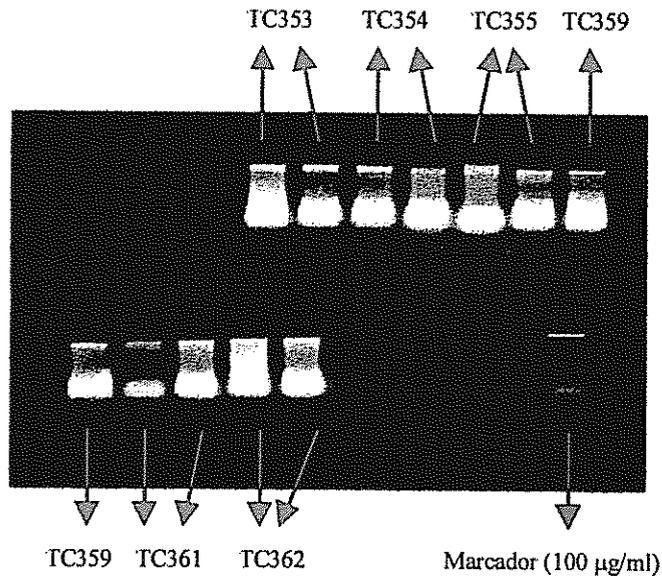
En el Anexo 18, se presenta el rendimiento de ADN obtenido y en el Cuadro 17, los promedios, valores mínimos y máximos, desviación estandar y coeficiente de variación (CV) para la variable rendimiento de ADN extraído de 31 entradas de *P. tuberosus*, con dos repeticiones. Se observaron cantidades de ADN entre 20 y 100  $\mu\text{g/ml}$  con un promedio para la colección de 79,6  $\mu\text{g/ml}$ . Las pruebas de Duncan detectan diferencias altamente significativas observándose que las entradas TC533A (ashipa) y TC553B (jíquima) presentan los valores más altos con 100  $\mu\text{g/ml}$ ; y la entrada TC530 (ashipa) el menor valor con 20  $\mu\text{g/ml}$ .



**Fig. 21.** Determinación de la concentración de ADN del grupo de jiquimas mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998.



**Fig. 22.** Determinación de la concentración de ADN de ashipas mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998



**Fig. 23.** Determinación de la concentración de ADN de chuines mediante electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998.

Esto indica que el rendimiento de ADN depende exclusivamente del genotipo ya que los mayores como menores valores lo obtuvieron dos entradas de ashipas. Esto demuestra que no existen diferencias en el rendimiento de ADN entre los tres grupos (chuines, ashipas y jíquimas) previamente clasificados etnobotánicamente por Sørensen (1996). La mayor parte de las entradas estuvieron cerca del promedio con un rango entre 60 y 80  $\mu\text{g/ml}$ .

**Cuadro 17.** Estadísticas descriptivas para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

Número de individuos	Valor mínimo (ng)	Valor máximo (ng)	Media (ng)	Desviación estándar (ng)	CV %
62	20,00	100,00	79,68	17,24	21,64

A su vez, el análisis estadístico (Cuadro 18) detecta diferencias altamente significativas entre las entradas ratificando que el rendimiento de ADN depende de la estructura genética individual del material.

**Cuadro.18.** Análisis estadístico para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

Fuente	g.l.	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	Valor de F	Probabilidad
Entrada	30	13018,54	433,95	2,62	0,0046**
Error	31	5125,00	165,32		
Total corregido	61	18143,54			

\*\* = altamente significativo

La cantidad extraída de ADN esta relacionada a la naturaleza del material ya que al repetir la extracción de un día a otro, se pudo notar que no aumenta la cantidad de ADN. El método utilizado (CTAB modificado) permitió extraer ADN de buena calidad y cantidad

suficiente para el trabajo con RAPDs. Además, los costos fueron relativamente bajos por muestra con un valor de 1,02 dólares (Anexo 20).

#### 4.2.2 Amplificación del ADN (RAPDs)

La amplificación del ADN se realizó satisfactoriamente ya que no se presentó ninguna clase de contaminación, es decir, se tuvo una adecuada manipulación de los reactivos de PCR siguiendo en forma ordenada los protocolos y separando las etapas pre-PCR de las pro-PCR, incluyendo un manejo cuidadoso de las pipetas, ya que por falta de equipo, éstas son utilizadas en las dos etapas y no como aconseja la literatura de utilizarlas exclusivamente para cada proceso, lo cual minimiza los riesgos por contaminación (Kwok y Higuchi, 1989; Dragon, 1993).

Se trabajó con 60 "primers" de la empresa Operón, específicamente de las series A, B y H, elegidas de acuerdo a investigaciones realizadas en Escocia en el mismo género y que presentaron polimorfismos (Estrella, comunicación personal). Además, se utilizaron una serie de 26 "primers" de la Universidad de British Columbia (UBC) (Cuadro 19).

Se realizó pruebas para encontrar la concentración óptima de cada uno de los "primers", que consistieron en evaluar inicialmente tres concentraciones por "primer" (0,3; 0,7 y 1  $\mu\text{M}$ ). Luego se trató de ajustar para cada "primer" la concentración que producía la mejor visualización de bandas. En el Cuadro 19 se detalla las concentraciones óptimas que produjeron amplificación de la colección, notándose en las series A, B y H de Operón que no se produjo amplificación en un 25% y las mejores concentraciones de amplificación estuvieron entre un rango de 0,3 a 1,2  $\mu\text{M}$ . En los "primers" UBC se produjo amplificación en un 23%, es decir, el 77% de los "primers" utilizados no amplificaron. Además, a diferencia de los Operón las óptimas concentraciones fueron mas bajas con un rango de 0,2 a 0,8  $\mu\text{M}$

Cuadro 19. Concentraciones de "primers" evaluados en la colección de *P. tuberosus* del banco de germoplasma del CATIE, 1998

PRIMER	CONCEN. ( $\mu$ M)	PRIMER	CONCEN. ( $\mu$ M)	PRIMER	CONCEN. ( $\mu$ M)
OPA1	0,4	OPB11	1,2	UBC1	n.a.
OPA2	0,5	OPB12	1	UBC2	n.a.
OPA3	0,4	OPB13	1,2	UBC3	n.a.
OPA4	1	OPB14	n.a.	UBC4	n.a.
OPA5	0,5	OPB15	1	UBC5	n.a.
OPA6	1	OPB16	n.a.	UBC6	n.a.
OPA7	1	OPB17	0,7	UBC7	n.a.
OPA8	1	OPB18	0,7	UBC8	n.a.
OPA9	0,4	OPB19	n.a.	UBC9	n.a.
OPA10	0,4	OPB20	n.a.	UBC10	n.a.
OPA11	0,3	OPH1	n.a.	UBC35	n.a.
OPA12	n.a.	OPH2	n.a.	UBC36	n.a.
OPA13	0,3	OPH3	0,7	UBC37	n.a.
OPA14	1	OPH4	1	UBC38	n.a.
OPA15	n.a.	OPH5	1	UBC39	n.a.
OPA16	0,5	OPH6	1	UBC70	n.a.
OPA17	0,7	OPH7	1	UBC71	n.a.
OPA18	0,6	OPH8	0,7	UBC72	0,2
OPA19	0,3	OPH9	0,7	UBC73	n.a.
OPA20	0,3	OPH10	n.a.	UBC74	n.a.
OPB1	1,2	OPH11	0,7	UBC101	0,2
OPB2	1,2	OPH12	0,7	UBC102	0,2
OPB3	1,2	OPH13	0,7	UBC103	0,2
OPB4	1	OPH14	n.a.	UBC104	0,2
OPB5	1,2	OPH15	0,7	UBC105	0,2
OPB6	n.a.	OPH16	n.a.	UBC535	0,8
OPB7	0,9	OPH17	0,7		
OPB8	n.a.	OPH18	1		
OPB9	n.a.	OPH19	n.a.		
OPB10	1,2	OPH20	0,7		

n.a. = no hubo amplificación

Los costos de sustancias y materiales utilizados en la amplificación mediante la técnica RAPDs fueron de 1,92 dólares por reacción. Este costo es relativamente bajo en comparación de las otras técnicas de marcadores moleculares (Anexo 21).

#### 4.2.3 Descripción del polimorfismo revelado

Las concentraciones para los “primers” polimórficos variaron entre 0,2 y 1  $\mu\text{M}$ , según se indica en el Cuadro 19. Para todos los “primers” la proporción de G-C fue mayor o igual a 60% (Williams *et al.*, 1990), tomando en cuenta que existe una mayor proporción de bases A-T en las cadenas de ADN que requieren de las bases complementarias respectivas al ser amplificadas (Cuadro 20).

La selección de los “primers polimórficos se basó en las pruebas realizadas con los 86 “primers” listados en el Cuadro 19, encontrándose 10 “primers” polimórficos, 7 de la empresa Operón y 3 de la Universidad de British Columbia (Cuadro 20).

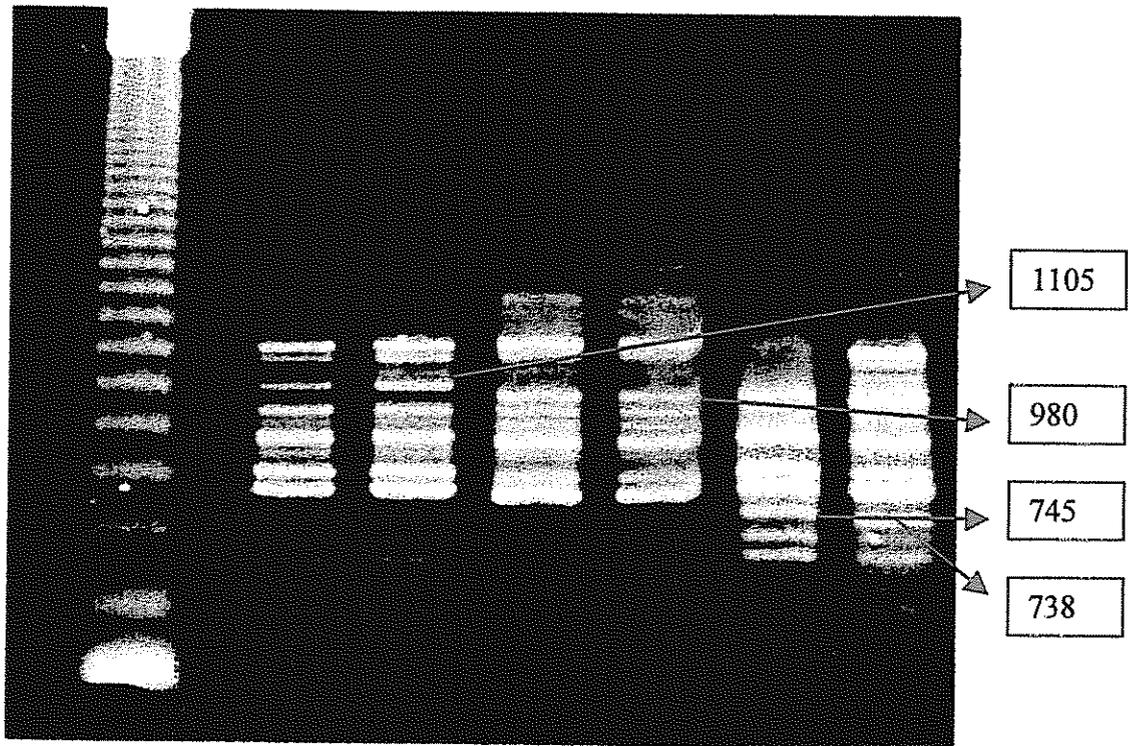
El número de bandas amplificadas para los diez “primers” varió desde cuatro hasta 15, mientras que el número de RAPDs polimórficos fue de uno a ocho. El total de RAPDs polimórficos representan el 32% del número máximo de bandas identificados (97), que es un indicador de la eficiencia de estos marcadores para revelar las diferencias entre individuos.

En las Figuras 24 y 25 se observan algunos de los resultados obtenidos por medio de RAPDs, observándose el polimorfismo existente entre los grupos identificados (chuines, jíquimas y ashipas) y entre individuos de un mismo grupo. En la Figura 24 se observan RAPDs polimórficos entre grupos de 735, 745, 980 y 1105 pb y entre individuos dentro de las ashipas de 735 y 745 pb. En la Figura 25 se observa RAPDs polimórficos entre ashipas y chuines de 800, 880, 920, 1000 y 1130. Además, se observa la TC525 con polimorfismos diferentes al patrón establecido para ashipa con el “primer” OPH8.

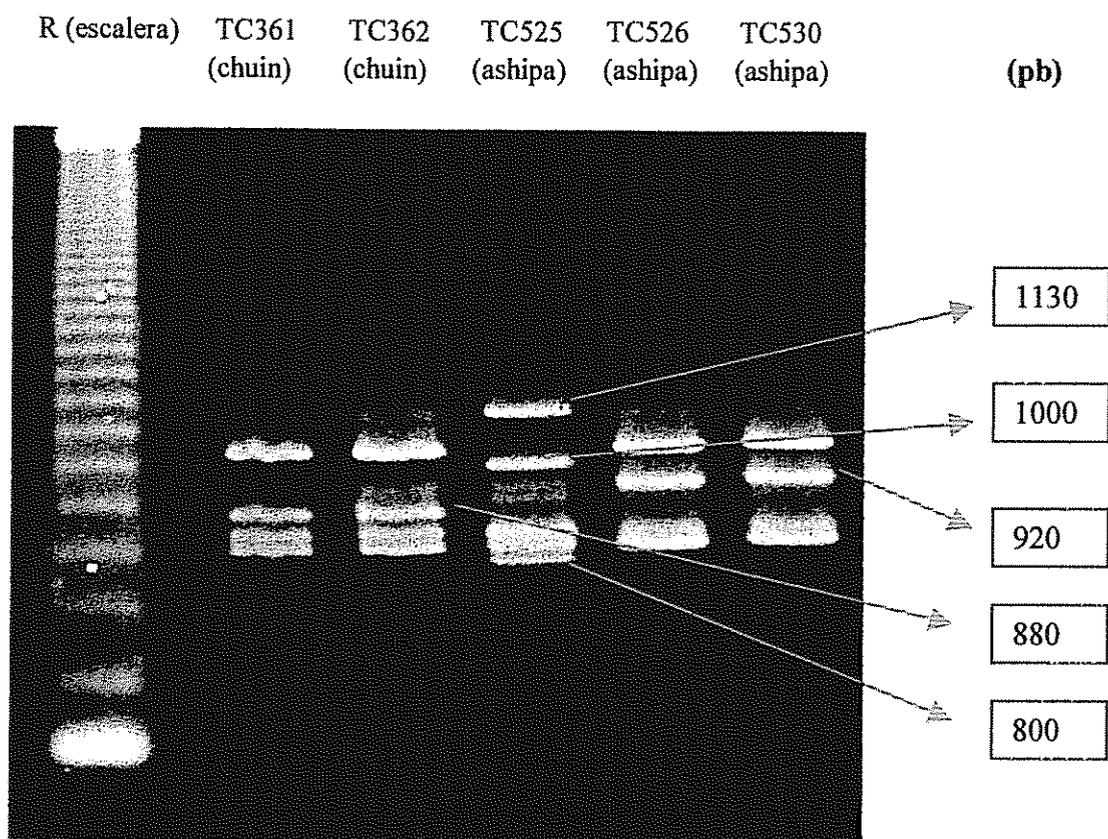
Cuadro 20. "Primers" polimórficos utilizados para la caracterización molecular de la colección de *P. tuberosus* del banco de germoplasma del CATIE, 1998.

Primer	G-C%	No. de bandas amplificadas		No. de bandas polimórficas	Tamaño de bandas polimórficas (pb)
		Máx.	Mín		
OPA3	60	7	5	2	810, 1120
OPA5	60	9	5	1	450
OPA8	60	7	5	2	460, 670
OPA13	60	8	6	3	810, 960, 1160
OPH5	70	5	4	2	700, 738
OPH8	60	8	4	6	800, 880, 920, 1000, 1107, 1130
OPH15	60	9	5	4	840, 850, 861, 1180
UBC72	70	15	9	6	738, 745, 861, 880, 980, 1105
UBC101	80	14	11	5	610, 630, 835, 850, 923
UBC535	60	15	8	1	740
<b>TOTAL</b>	----	<b>97 (100%)</b>		<b>32 (32,9%)</b>	-----

R (escalera) TC354 TC355 TC551 TC552 TC530 TC531  
 (chuin) (chuin) (jiquima) (jiquima) (ashipa) (ashipa) (pb)



**Fig. 24.** Ejemplo de una amplificación de ADN de *P. tuberosus* con la técnica RAPDs y el “primer” UBC72 en muestras de chuines, jiquimas y ashipas de la colección de germoplasma. “R” o escalera, es el ADN de referencia con fragmentos revelados cada 123 pb. CATIE, 1998.



**Fig. 25.** Ejemplo de amplificación de ADN de *P. tuberosus* con la técnica RAPDs y el “primer” OPH8 en muestras de chuines y ashipas de la colección de germoplasma. “R” o escalera es el ADN de referencia con fragmentos revelados cada 123 pb. CATIE, 1998.

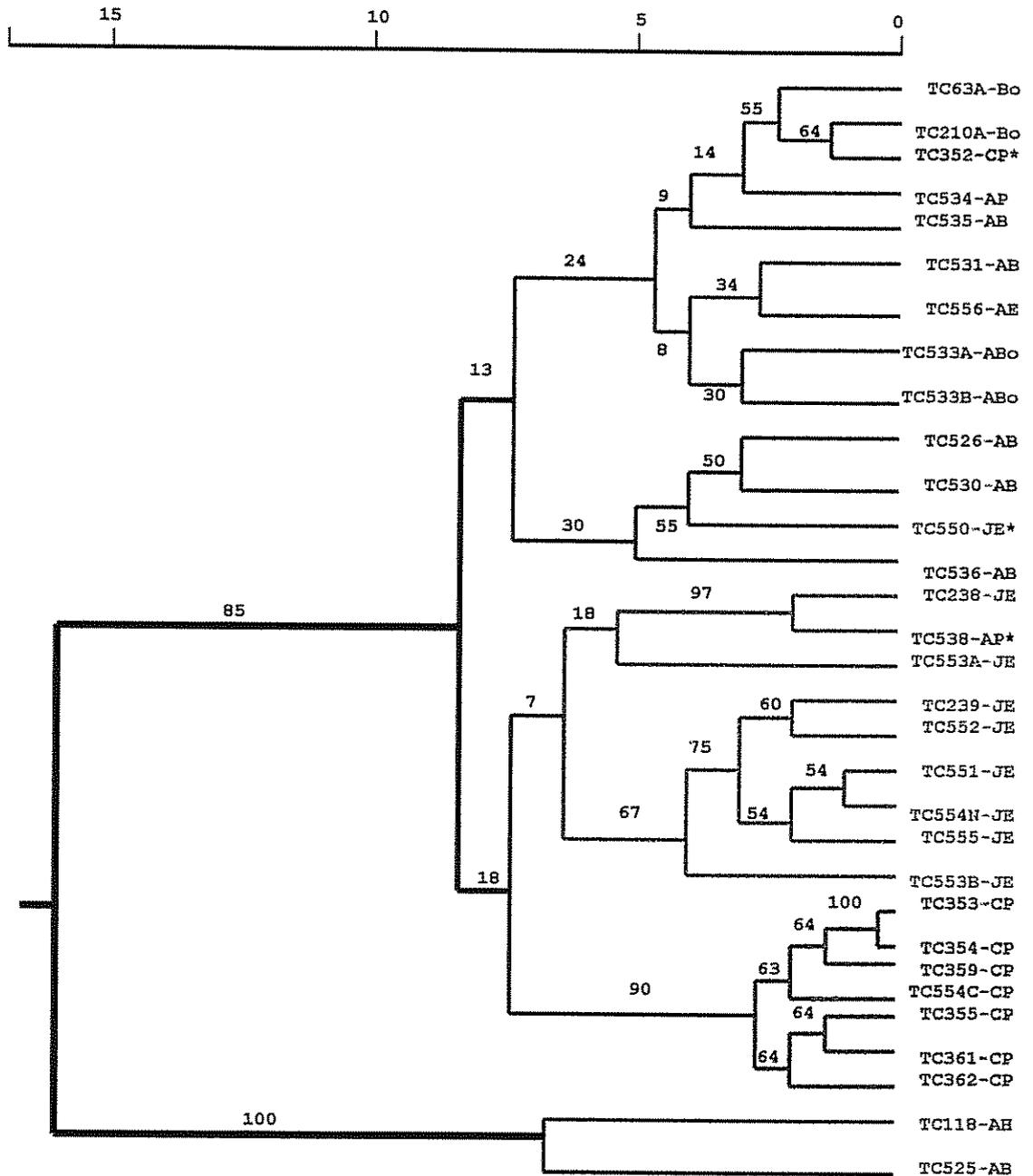
#### 4.2.4. Caracterización de la colección de *P. tuberosus*

Los RAPDs generados (32 bandas polimórficas) fueron usadas para determinar las relaciones entre las 31 entradas de *P. tuberosus*. Como lo indica el flujograma de la Fig. 2, el análisis "cluster" produjo un dendograma UPGMA y un consenso "bootstrap" (Fig. 26) analizados con el paquete estadístico Popgene y Winboot respectivamente y basados en la matriz de distancia de Nei (1979) (Anexo 19).

##### Matriz de distancias y dendograma

Las distancias entre las entradas de *P. tuberosus* están entre un rango de 0 a 0,90; siendo los individuos más similares: TC210 (ashipa-Bolivia) y TC352 (Perú); TC353 y TC354 (chuines-Perú); TC353, TC354 con TC359 (chuin-Perú); TC355 con TC361, TC362 (chuines-Perú); TC361 y TC362 (chuines-Perú); TC353, TC354, TC359 con TC554C (chuines-Perú). La entrada TC554N y TC555 (jíquima-Ecuador); TC 554N, TC555 con TC551 (jíquima-Ecuador). Las entradas más disimiles son TC525 (ashipa-Brasil) y TC552 (jíquima-Ecuador) (Anexo 19). El análisis estadístico reflejado en el dendograma identificó cuatro grupos de individuos muy similares a los clasificados morfoetnobotánicamente por Sørensen (1996), es decir, chuines (C), ashipas (A) y jíquimas (J), además dos individuos que son los más divergentes de los otros tres grupos, las ashipas TC118 y TC525.

Dentro de cada grupo se puede observar subgrupos cuyas distancias son relativamente pequeñas entre ellos, es así que en el grupo de las ashipas se distinguen tres subgrupos, en cambio en los chuines y jíquimas se observan dos subgrupos (Fig. 26).



\* entradas que no corresponden su genotipo a los datos pasaporte.

- = grupo 1
- = grupo 4
- = grupo 3
- = grupo 2

A = ashipa; C = chuín; J = jíquima      Bo=Bolivia; P=Perú; H=Haití; B=Brasil; E=Ecuador

Fig. 26 UPGMA dendrograma y "Bootstrap" (2000 replications) de la colección de *P. tuberosus* basado en distancias genéticas de Nei (1979). CATIE, 1998.

Por otro lado, en el dendograma se observa el grupo de los chuines distribuido geográficamente únicamente en Perú (P), las jíquimas solamente en Ecuador (E) y las ashipas tiene una más amplia distribución encontrándose en Ecuador, Perú, Bolivia (Bo) y Brasil (B) (Fig. 26).

### "Bootstrap"

Felsenstein (1985), manifiesta que solamente grupos con valores de bootstrap de 95% o más grande puede ser considerado significativo. Siguiendo esta regla, solamente el grupo constituido por las entradas TC525 y TC118 con un valor de 100% es un grupo fuerte o bien conformado. Además, dentro del grupo de las jíquimas, se observa un subgrupo constituido por las entradas TC538 y TC238 que es también fuerte con un valor de 97%; y en el grupo de los chuines las líneas TC353 y TC354 con un valor de 100%. Aunque el brazo que forma los tres grupos es relativamente bajo en su valor bootstrap con 85%, se le puede considerar como un brazo fuerte para separar los tres grupos (ashipas, chuines y jíquimas). Al igual el brazo del grupo de los chuines es bien conformado con un valor de 90% y es distintivo de los otros grupos. Los brazos que agrupan a las ashipas y jíquimas son muy débiles con valores muy bajos (Fig. 26).

### Pruebas de $X^2$

Por medio de una prueba de  $X^2$  se procedió a reconocer la importancia o el aporte de cada uno de las 32 bandas polimórficas, distinguiéndose 25 de ellas con efecto significativo, por lo tanto, los marcadores OPA3-2, OPA13-3, OPH5-1, OPH8-1, UBC72-4, UBC72-5 y UBC101-3 fueron los que no tuvieron un aporte significativo en la formación de los grupos. Las frecuencias de ausencia o presencia indican un predominio de alelos con 0, es decir, con ausencia de la banda (Cuadro 21).

Cuadro 21. Pruebas de  $X^2$  para los RAPDs polimórficos y sus frecuencias de presencia y ausencia, con el coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998.

MARCADOR	FRECUENCIAS		$X^2$	Probabilidad
	0 <sup>(a)</sup> (%)	1 <sup>(b)</sup> (%)		
OPA03-1	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPA03-2	98,3	1,7	1,3	0,734 <sup>ns</sup>
OPA05-1	74,9	25,1	13,9	0,003**
OPA08-1	28,5	71,5	17,1	0,001**
OPA08-2	65,1	34,9	21,3	0,001**
OPA13-1	32,5	67,5	17,0	0,001**
OPA13-2	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPA13-3	85,4	14,6	3,1	0,376 <sup>ns</sup>
OPH5-1	72,8	27,2	2,8	0,426 <sup>ns</sup>
OPH5-2	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPH08-1	98,3	1,7	0,7	0,868 <sup>ns</sup>
OPH08-2	6,4	93,6	31,0	0,001**
OPH08-3	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH08-4	77,4	22,6	31,0	0,001**
OPH08-5	26,0	74,0	15,1	0,001**
OPH08-6	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPH15-1	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH15-2	27,4	72,6	28,5	0,001**
OPH15-3	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH15-4	6,4	93,6	31,0	0,001**
UBC72-1	6,4	93,6	31,0	0,001**
UBC72-2	22,6	77,4	31,0	0,001**
UBC72-3	93,5	6,5	31,0	0,001**
UBC72-4	98,3	1,7	0,7	0,868 <sup>ns</sup>
UBC72-5	98,3	1,7	0,7	0,868 <sup>ns</sup>
UBC72-6	90,3	9,7	8,1	0,043*
UBC101-1	23,7	76,3	23,5	0,001**
UBC101-2	98,1	1,9	8,6	0,034*
UBC101-3	96,6	3,4	2,7	0,441 <sup>ns</sup>
UBC101-4	20,1	79,9	10,8	0,012*
UBC101-5	98,1	1,9	8,6	0,034*
UBC535-1	77,3	22,7	14,1	0,002**

<sup>(a)</sup> 0 = ausencia

<sup>(b)</sup> 1 = presencia

ns = no significativo

\* = significativo al 5%

\*\* = significativo al 1%

### Análisis discriminante canónico y análisis de correspondencia

Los resultados del análisis de  $X^2$  son ratificados al realizar el análisis canónico discriminante, coincidiendo en los valores de significancia para las bandas polimórficas. El resultado de este análisis indica que la variable canónica CAN1 explica un 90% de la variación total, por lo tanto, el valor restante de 10% es explicado por la CAN2.

Los marcadores con mayor aporte en el CAN1 fueron el OPA3-1, OPH8-3, OPH15-1, UBC101-2, OPA13-1 y OPA5 con valores de correlación de 1,0; 0,695; 0,695; 0,695; -0,486 y 0,354 respectivamente. Para la variable CAN2 los marcadores con mejor aporte para la formación de grupos fueron UBC72-2 (-0,787), H15-2 (0,783) y UBC535 (-0,641).

La Fig. 27 representa la ubicación espacial de los individuos de acuerdo a las ecuaciones construidas a partir de los coeficientes canónicos brutos, calculados con los valores individuales para cada marcador en cada uno de los 31 individuos. Se aprecia al igual que en el dendograma de la Fig. 23, cuatro grupos bien constituidos de jíquimas, chuines, ashipas y los probables híbridos. La CAN1 separa el grupo 4 de los posibles híbridos de ashipa con los demás grupos. Mientras que la CAN2 separa el grupo 1, 2, y 3 que contienen a las ashipas, chuines y jíquimas. Además en la Fig. 25 se aprecia que las distancias que separan los grupos son entre 1 y 2 de 0,17; 1 y 3 de 0,14; entre 2 y 3 de 0,16; lo que indica similitud entre estos tres grupos, en cambio, las distancias con el grupo 4 son alrededor de 0,54 a 0,56. Es así, que el análisis de correspondencia ratifica los resultados obtenidos en el análisis canónico discriminante ubicándose los grupos de chuines, ashipas y jíquimas a distancias muy cortas, en cambio, los híbridos muy separados de los demás grupos (Fig. 28).

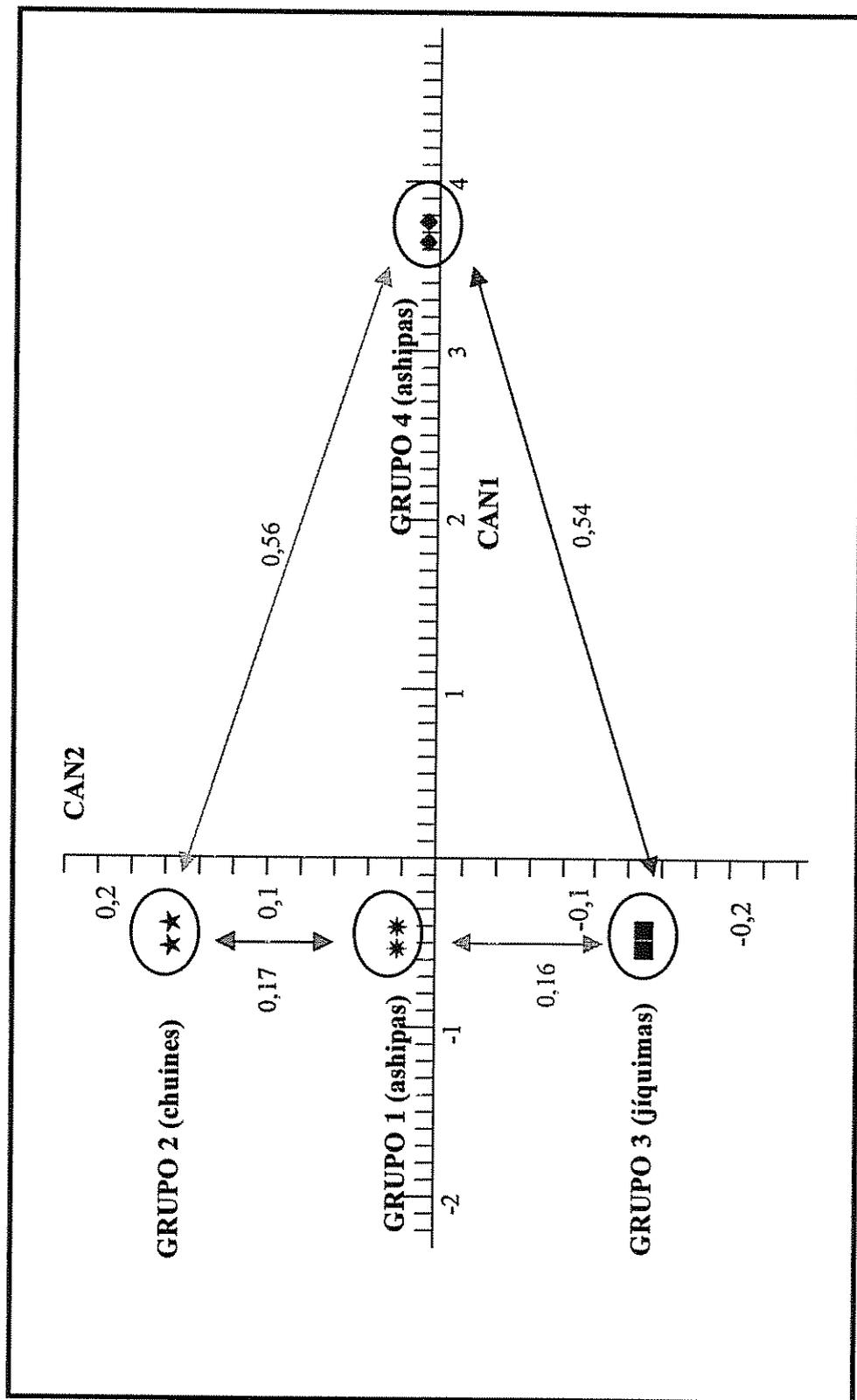
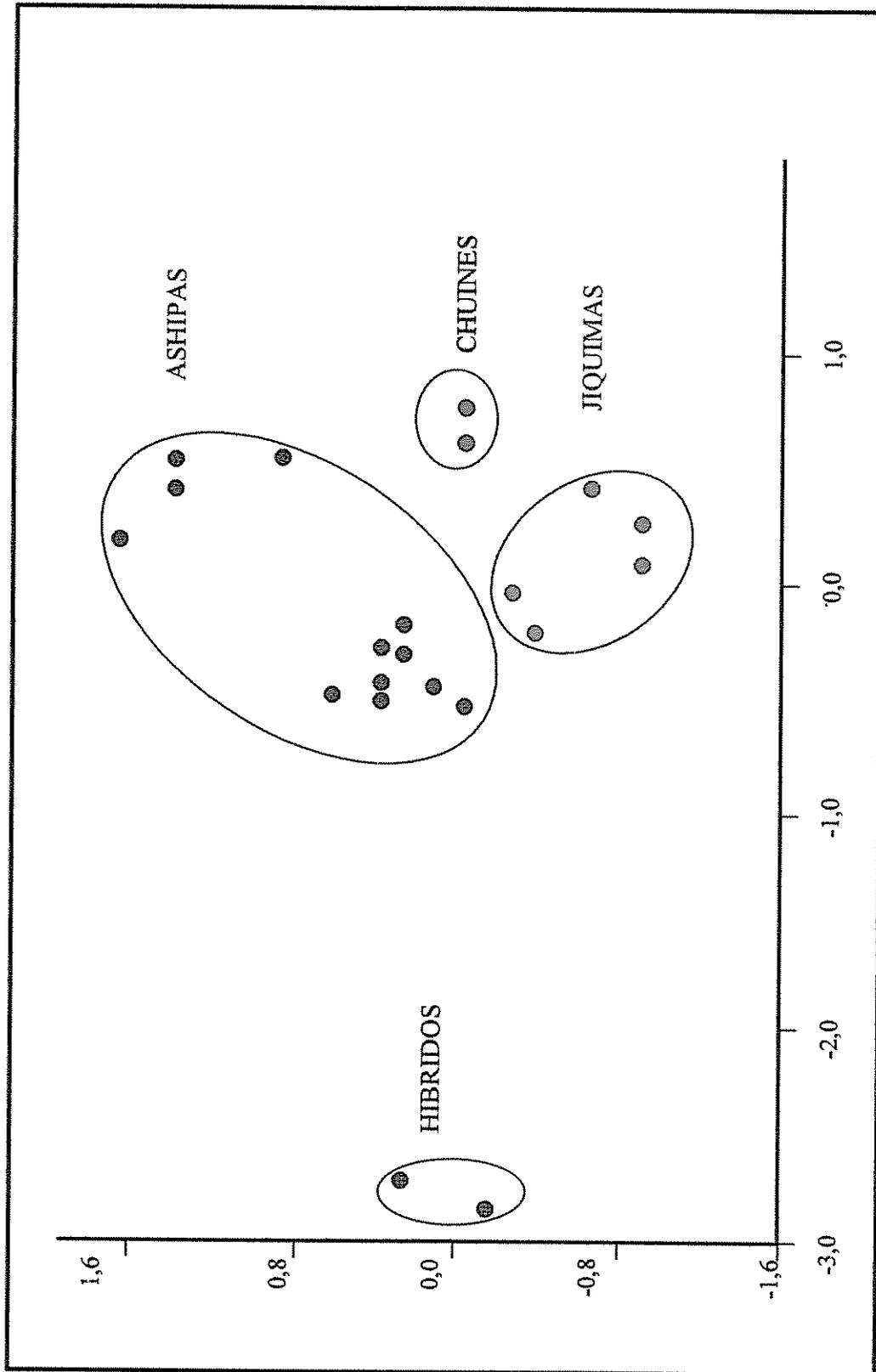


Fig. 27. Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998.



**Fig. 28.** Distribución de los individuos mediante el programa MATRIXPLOT del software ntsys-pc, procedentes del análisis de correspondencia. CATIE, 1998.

### 4.3. RELACIÓN ENTRE LOS MARCADORES MORFOLÓGICOS Y MOLECULARES

Se utilizó para la comparación entre los caracteres morfológicos y moleculares, las matrices de distancias de Gower (1967) y Nei (1979), respectivamente. Mediante el programa MXCOMP del software ntsys-pc se analizó la correlación de las dos matrices y se identificó la significancia mediante el valor  $t$  de Mantel (1967) que fue comparado con el valor de la probabilidad para  $Z$  derivado de 2000 permutaciones al azar (flujograma de la Fig. 3). En el Cuadro 22 se observa que las 16 diferentes combinaciones de marcadores morfológicos relacionados con los 32 y 25 polimorfismos, dieron en todos los casos, valores significativos o altamente significativos, a excepción de los caracteres cuantitativos cuando fueron analizados separadamente, es decir, por un lado los siete más discriminantes y por el otro, el resto de estos caracteres (33).

Además se detectó que los caracteres cualitativos relacionados con las matrices de 32 y 25 polimorfismos fueron los que presentaron altos valores de correlación (0,43 y 0,33; respectivamente), obteniéndose valores similares cuando se analizó estos caracteres en dos grupos: los más discriminantes (10) y el resto de caracteres (20). Los mayores valores de correlación fueron para los 32 y 25 polimorfismos con los 20 caracteres cualitativos que obtuvieron en el análisis discriminatorio valores bajos, siendo de 0,47 y 0,42.

Al comparar los resultados de correlación obtenidos cuando se utilizó los 32 y 25 polimorfismos se identificó que los valores disminuyen cuando se excluyen polimorfismos, es así, que la correlación con 32 bandas fue de 0,40 y con 25 de 0,29. Este mismo comportamiento se observó en las demás combinaciones, inclusive se detectó que los caracteres cuantitativos más discriminantes no tienen ninguna relación con las 25 bandas polimórficas (Cuadro 22).

**Cuadro 22.** Relación de las matrices de distancias entre diferentes caracteres morfológicos y marcadores moleculares. CATIE, 1988.

MARCADOR MORFOLÓGICO	MARCADOR MOLECULAR	r*	MARCADOR MOLECULAR	r*
Todos los 70 caracteres	32 bandas	0,40**	25 bandas	0,29**
Todos los caracteres cualitativos (30)	32 bandas	0,43**	25 bandas	0,33**
Todos los caracteres cuantitativos (40)	32 bandas	0,29**	25 bandas	0,19**
Caracteres cualitativos. y cuantitativos. con mayor valor discriminante (17)	32 bandas	0,30**	25 bandas	0,14*
Caracteres cualitativos con mayor valor discriminante (10)	32 bandas	0,41**	25 bandas	0,26**
Caracteres cuantitativos con mayor valor discriminante (7)	32 bandas	0,15 <sup>ns</sup>	25 bandas	0,00 <sup>ns</sup>
Resto de caracteres cualitativos (20)	32 bandas	0,47**	25 bandas	0,42**
Resto de caracteres cuantitativos (33)	32 bandas	0,15 <sup>ns</sup>	25 bandas	0,00 <sup>ns</sup>

\* = Correlación entre las matrices de distancias.

## 5. DISCUSIÓN

La evaluación de la variabilidad genética de la colección de *P. tuberosus* mediante su caracterización morfoagronómica y molecular, permitió identificar cuatro grupos de materiales que coinciden casi por completo con la clasificación propuesta por Sørensen (1996), basada en datos etnobotánicos y en pocos caracteres fenotípicos pero de cierta importancia discriminante. Se identificó entre grupos y entradas dentro de grupos 10 caracteres cualitativos y 7 cuantitativos con mayor poder discriminante, siendo la forma y tipo del lóbulo del foliolo de la hoja, color de la pulpa de la raíz, hábito de crecimiento, días a la floración y días a la madurez fisiológica, los caracteres más útiles para utilizarse en una descripción inicial. La muestra mínima para caracteres cualitativos fue de 1 a 5 repeticiones y para caracteres cuantitativos con una muestra mínima de 20 a 50 y una precisión aceptable, se identificó a la relación largo/ancho del foliolo principal de la hoja y días a la madurez fisiológica de la vaina. Las entradas con menor variabilidad genética para los caracteres cuantitativos fueron la longitud de la flor, ancho del estandarte, relación largo/ancho del foliolo de la hoja y días a la madurez fisiológica.

Con base en lo anterior, el análisis morfológico permitió identificar los niveles de variabilidad, y con esta información se podría determinar en el futuro la respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos; además, las correlaciones genéticas y las fuerzas de selección pueden ser inferidas (Wolff, 1988). Además, la caracterización de este grupo de genotipos, permitió ampliar los conocimientos de la variabilidad genética del género, facilitando así la identificación de materiales con características deseables como son alta producción, además de otras características taxonómicas de utilidad como por ejemplo, el hábito de crecimiento y vigor de la planta, útiles para los programas de mejoramiento.

La técnica RAPD contribuyó en la investigación a una mejor caracterización de la colección y a la detección de posibles duplicados. Además se detectó errores de etiquetado en las entradas TC550, TC352 y TC538, lo cual es reforzado con los resultados morfológicos. La

entrada TC553A que se había agrupado como una ashipa en el fenograma morfológico, en la caracterización molecular se agrupó como una jíquima, lo cual permite por medio de esta técnica asignar la correcta ubicación de este material. Otra de las ventajas de los marcadores moleculares que contribuyeron en el presente estudio fue como se dijo anteriormente la posible identificación de dos materiales (TC118 y TC525) como posibles híbridos entre *P. tuberosus* y *P. erosus* producto de ciertas multiplicaciones realizadas en conjunto de materiales de las dos especies (Sørensen, comun. personal). Es así que la importancia de la caracterización molecular fue evidente al permitir un agrupamiento más preciso y consistente de los materiales que el análisis morfológicos había disgregado.

Por lo tanto, la metodología usada con marcadores RAPD's para la caracterización molecular logró evaluar en forma precisa la variabilidad de *P. tuberosus*, ubicar correctamente a los materiales, identificar duplicados y errores de etiquetado de las entradas, lo cual favorece notablemente la elaboración y uso de datos pasaporte y caracterización de germoplasma y conocer en forma veraz el potencial de un genotipo.

La caracterización morfológica y molecular han proporcionado la información necesaria para caracterizar los individuos y, por lo tanto, la futura contribución para el mejoramiento genético. A continuación se discutirá en forma detallada y separada los dos tipos de caracterización y la relación que se pudo observar en los resultados obtenidos.

### **5.1. Fase de campo**

Según la caracterización morfológica, existen cuatro diferentes grupos genéticos que coinciden con los tres grupos que tradicionalmente se han clasificado los genotipos de *P. tuberosus*: ashipas (grupo 1 y 4), chuines (grupo 2) y jíquimas (grupo 3).

Los caracteres cualitativos que mejor discriminan entre estos grupos fueron diez, de los cuales la forma y el tipo del foliolo central de la hoja, color de la pulpa de la raíz y la forma de la semilla son los que se identifican con los mejores valores. Se puede notar que no existe una

parte de la planta exclusiva para diferenciar grupos, aportando para este fin caracteres de todas las partes. Además, este tipo de caracteres no son muy influenciados por el medio ambiente, por lo tanto, el tamaño de muestra mínima es pequeño, lo cual facilita notablemente la toma de datos en campo y ahorra tiempo y dinero. Esto concuerda con las investigaciones de Leakey (1988) en otra leguminosa como frijol, en donde se resalta la importancia de usar descriptores fenotípicos de herencia simple (cualitativos) para la caracterización y futuros trabajos de mejoramiento. En la investigación realizada por Márquez (1992) en *P. erosus*, se encontró que algunos caracteres cualitativos con mayor valor discriminante son los mismos que en el presente estudio, lo cual indicaría que ciertos caracteres como hábito de crecimiento, forma del lóbulo central del foliolo de la hoja, velocidad de crecimiento del tallo principal y número de días a la floración podrían ser recomendados para utilizarse en una caracterización de todo el género *Pachyrhizus*.

Los caracteres cuantitativos que separan entre grupos fueron cinco, todos relacionados con partes de la hoja y de la vaina, de los cuales dos estuvieron muy relacionados directamente entre sí, como son: el número de días a la floración y el número de días a la madurez fisiológica de la vaina. El ancho, la relación L/A del foliolo principal de la hoja y el ancho de la vaina son los otros tres caracteres que ayudan a separar entre grupos, por lo tanto, la hoja y la vaina son partes de la planta importantes para la diferenciación y con valores de heredabilidad aceptables que nos lleva a tomarlos muy en cuenta por no ser muy influenciados por el medio ambiente. Además, caracteres como L/A del foliolo y días a la madurez fisiológica requieren de tamaños de muestra relativamente bajos y aceptables. Márquez (1992) en *P. erosus* identificó otros caracteres cuantitativos útiles solamente para esa especie como son: período de floración, número máximo de botones florales por inflorescencia, número de ramas por planta, número inflorescencias por rama y número de hojas por planta. Esto sugiere que en *P. erosus* los caracteres relacionados con la flor contribuyen más a la diferenciación de grupos, en tanto que en *P. tuberosus*, caracteres de la hoja y de la vaina son los más discriminantes.

Tanto los caracteres cualitativos como los cuantitativos más discriminantes presentaron otras cualidades interesantes como alta heredabilidad y pequeños tamaños de muestra, lo cual los convierten en una herramienta potencial para la caracterización morfológica de *P. tuberosus*.

Similar a los caracteres cualitativos que separan los grupos, los que separan entradas dentro de cada grupo, coincidieron en la mayoría de los descriptores, observándose que la forma y el tipo de lóbulo del foliolo central de la hoja, hábito de crecimiento y color de los sépalos de la flor presentaron altos valores discriminantes. Los  $D'$  recalculados para estos caracteres fueron la forma y tipo de lóbulo central del foliolo de la hoja, color de la vaina inmadura y curvatura de la vaina, los cuales se los puede considerar como los más útiles para separar entradas dentro de grupos. Estos resultados nos indican que los caracteres cualitativos que mejor discriminan son universales para evaluar tanto entre grupos como entre entradas dentro de grupos con todas las ventajas que se han mencionado.

El número de estados de un carácter cualitativo juega un papel muy importante en su poder discriminante debido a que a mayor número de estados, mayor será su poder discriminante. Este efecto fue observado por López (1991), Márquez (1992) y Engels (1983b) en *Pachyrhizus*, *Ipomoea* y *Theobroma*, respectivamente. Este comportamiento también se observó en esta investigación presentando el tipo de lóbulos del foliolo central de la hoja, defectos de la superficie de la raíz y la forma de la raíz el mayor número de estados y altos valores discriminantes, aunque no los máximos.

Los caracteres cuantitativos que separan entradas dentro de cada grupo tuvieron valores relativamente bajos para discriminar o separar las entradas, ubicándose la relación L/A de la raíz y el porcentaje de materia seca por planta como los más altos. Al recalcularse los  $D'w$  se observó que descriptores como días a la madurez fisiológica y a la floración, fueron similares para la separación de grupos y entre entradas. Al igual que Engels (1983a) se confirma que los caracteres cuantitativos con alto poder discriminante entre grupos, no necesariamente son

útiles también para discriminar entre entradas, aunque existen algunos caracteres que si lo hacen como se demuestra en esta investigación.

Sørensen *et al* (1997) realizaron una caracterización preliminar de *P. tuberosus* utilizando 31 entradas y 23 caracteres, la mayoría referidos a la flor y hoja. Encontraron que caracteres del pétalo y la relación L/A de la hoja fueron los que más contribuyeron para la agrupación de los genotipos. Como se puede ver, no existe una clara similitud con los caracteres identificados en el presente estudio, debido probablemente a la poca cantidad de caracteres evaluados por los autores (23), en contraste, con la presente investigación en que se consideraron 70 caracteres.

Con base en los resultados obtenidos para los caracteres cualitativos y cuantitativos entre entradas y entre grupos, se puede afirmar que existe mayor variabilidad genética entre los cuatro grupos conformados, que entre entradas dentro de cada grupo.

Las entradas denominadas ashipas (grupo 1) provienen de Brasil y Bolivia. En este grupo existen ciertos genotipos como TC550 y TC352 que fueron clasificados al momento de su colecta, como jíquima y chuín originarios de Ecuador y Perú respectivamente, pero que su morfología es similar a las ashipas, por lo que es probable que pertenezcan a este grupo. En algún sitio cuando se refrescó el material se cometió alguna equivocación en su identificación (mutación de etiqueta) y se los clasificó mal. El material de Haití está bien clasificado pero su centro de origen es erróneo ya que en Haití no se sabe que sea un centro de origen de *P. tuberosus* (Sørensen, 1996). Seguramente, al no haber datos pasaporte de este material se le asignó a Haití como el país de refrescamiento. Por último, existe en el grupo 1 la entrada TC553A que se agrupa como ashipa y es según los datos pasaporte una jíquima. La caracterización molecular ayudó a clasificar este material en forma correcta.

El agrupamiento 2 contiene entradas originarias exclusivamente de las orillas del río Ucayali en la Amazonia peruana. De igual forma, el agrupamiento 3 se conformó solamente

con materiales provenientes de la costa pacífica de Ecuador (Sørensen *et al*, 1997), notándose al igual que en el agrupamiento 1, un genotipo clasificado como ashipa (TC538) dentro de las jíquimas, lo que indica que existió otra “mutación de etiqueta” o equivocación en la rotulación del genotipo.

El agrupamiento 4 tiene relación con el grupo 1, pues está constituido también por ashipas, pero a diferencia de este que tenía materiales de Bolivia y Brasil, en el grupo 4 hay materiales de Brasil, Ecuador y Perú. A pesar de conformar el grupo solamente cuatro entradas se observa una más amplia distribución geográfica y esto es posiblemente debido al transporte de semilla a lo largo de los ríos de la Amazonia ecuatoriana y peruana que van a confluir en el río Amazonas en Brasil.

Es difícil determinar la distribución natural de *P. tuberosus* ya que esta especie ha estado por mucho tiempo en cultivo en varias partes de Sur América. Pero si se puede presumir que los chuines y jíquimas que presentan pequeñas variaciones en su morfología, pueden ser el resultado de una única introducción desde comunidades vecinas. Con las ashipas en cambio es más complicado ya que la dispersión de estos materiales desde su centro de origen, pudo ser fluvialmente como parece que sucedió en Brasil, pero también por la colecta e intercambio de los materiales entre bancos de germoplasma y comunidades indígenas mediante el apoyo económico del proyecto “Yam Bean”.

Realizando una comparación en cuanto a los caracteres cualitativos de mayor poder discriminante entre los grupos, se puede notar que los chuines son únicos con lóbulos oblongos superficiales, al contrario de las jíquimas que presentan forma lanceolada y el tipo de lóbulos profundos. El grupo de las ashipas es totalmente diferente a los chuines y jíquimas ya que su hoja es entera en los tres folíolos. Estas características son las más relevantes para diferenciar los grupos de variabilidad de *P. tuberosus*.

Las ashipas y las jíquimas presentan la pulpa de la raíz de color blanco, a excepción de las ashipas del grupo 4; distinguiéndose los chuines y éstas por presentar colores amarillos y

blanco con morado, al igual que los colores reportados por Sørensen (1996) y que se observan en el Cuadro 1. La forma de la semilla se presentó como un descriptor interesante para diferenciar entre los chuines (semilla aplanada), jíquimas (semilla redondeada) y 7 entradas de ashipas (semiaplanada). En general, las ashipas son las que presentaron la mayor variabilidad entre ellas, con formas redondeadas, semiaplanadas y aplanadas.

Es evidente que el grupo de los chuines es el de más lento crecimiento, por lo tanto, es un material con ciclo vegetativo tardío, al contrario de las jíquimas, que aunque presentaron una velocidad de crecimiento del tallo principal intermedio, son las más precoces. Es interesante mencionar que el 50% de las ashipas son muy rápidas en el crecimiento del tallo pero de un ciclo vegetativo intermedio entre los chuines y jíquimas, aunque con una longitud de planta superior a las antes mencionadas.

Tanto las ashipas como los chuines genéticamente presentan un hábito de crecimiento entre semitrepador y trepador con longitudes de planta que alcanzan hasta 12 m. En cambio, las jíquimas son de porte pequeño con hábito de semiarbusivo a arbustivo.

Estas características morfológicas evidencian claramente que la mayor variabilidad entre accesiones se observó en las ashipas, lo que se debe a que por tener un rango mayor de distribución geográfica produjo una mayor segregación y recombinación de los materiales, a pesar que es una especie autógama, pero con cierto porcentaje, aunque bajo de alogamia.

Los grupos de 1 y 4 tienen una relación muy estrecha, es decir, son similares morfológicamente, lo cual es razonable ya que según Sørensen (1996), pertenecen al mismo grupo denominado como ashipas. El mayor grado de disimilitud o grupos más separados fenotípicamente correspondió al grupo 1 de las ashipas con el grupo 2 de los chuines. Igualmente sucedió con las jíquimas (grupo 3) que morfológicamente fue diferente a los chuines (grupo 2) y con distancias más pequeñas y por lo tanto más similar a las ashipas (grupos 1 y 4). Parecería que existe más caracteres morfológicos afines entre las ashipas y

jíquimas, a pesar de que su arquitectura a simple vista es muy diferente principalmente en la vaina y el hábito de crecimiento.

Por otro lado, la muestra mínima para los caracteres cualitativos a una probabilidad del 5% fue baja, lo cual es razonable ya que este tipo de caracteres no presenta mucha variación por ser generalmente monogénicos, y por lo tanto, no son muy influenciados por condiciones ambientales (alta heredabilidad), es así, que una muestra mínima de 1 a 5 repeticiones de acuerdo a los resultados es suficiente para lograr una buena estimación. Es decir, que en este estudio se utilizaron un número exagerado de repeticiones (35) Esta consideración como se dijo anteriormente es de importancia pues los caracteres cualitativos fueron los que mostraron mejor relación con la caracterización molecular.

En cambio, para los caracteres cuantitativos a la misma probabilidad se observó que con un límite de error de 5, 10 y 25% se puede obtener una muestra mínima adecuada dependiendo del carácter, notándose solamente adecuados ciertos de ellos para recomendarlos como prácticos, es decir, con repeticiones menores a 30 mediciones (Enríquez, 1966; Morera, 1981). Estos autores utilizaron la fórmula de Pound (1932) para estimar el tamaño de muestra en la caracterización de cacao y pejíbaye, respectivamente; a una probabilidad de 5%, con la cual encontraron diferentes tamaños variando de la misma forma que en la presente investigación, es decir, con caracteres que necesitan ser muestreados muchas veces si se quiere lograr una precisión aceptable (5 a 10%), así como, caracteres que necesitan un muestreo menor con alta precisión, como la relación L/A del foliolo principal de la hoja.

En *P. tuberosus*, existen caracteres como peso de raíz tuberosa por planta, número de vainas, rendimiento de semilla, entre otros, que necesariamente tendrían que registrarse el número de mediciones que se indica a un límite de error del 5 o 10%, ya que caracterizar los genotipos con un menor número de muestras podría ocasionar una mala estimación del potencial de la colección. Por supuesto, existen ciertas variables con tamaño de muestra muy grande que son fáciles de evaluar y que se podría tomar utilizar en la caracterización. Los CV en estos caracteres son bastante elevados, lo cual indica que se tendría que tomar un número

mayor de mediciones, por lo tanto, estos caracteres no son recomendables para una futura descripción (elevados costos y mucho tiempo y personal para caracterizarlos). Sin embargo, es una decisión del investigador con base en los objetivos de la investigación y al conocimiento de la especie, involucrar o no estos caracteres y decidir la mejor probabilidad para conseguir una muestra mínima que de una buena estimación. Además que son caracteres de importancia comercial que son fundamentales para programas de mejoramiento.

La variabilidad genética de la colección de *P. tuberosus* presentó algunos caracteres asociados con la raíz con grandes variaciones debidas principalmente a efectos medioambientales y de suelo. En igual forma, el número de vainas al igual que Márquez (1992), tuvo coeficientes altos producto de la caída de botones florales por efecto del viento, lo cual ocasionó una evidente variación en el peso de la semilla ya que se perdió vainas potenciales y por lo tanto semilla, lo cual se refleja en el peso. Los descriptores relacionados con longitud y ancho de la hoja, flor, vaina y semilla fueron los menos influenciados por efectos ambientales.

Los promedios obtenidos en la presente investigación por grupos de entradas según la clasificación de Sørensen (1996), como son las ashipas, chuines y jíquimas; indicaron que los caracteres que mejor diferencian entre grupos de entradas son: días a la floración, largo de la flor, ancho del estandarte la flor, número de botones florales por inflorescencia, largo de los estambres, largo del tallo principal, número de ramas con inflorescencia, ancho del foliolo principal de la hoja, relación L/A de la hoja y días a la madurez fisiológica. Estos descriptores cuantitativos al compararlos con los identificados como los más discriminantes del análisis multivariado coincidieron en días a la floración y a la madurez fisiológica de la vaina y la relación L/A del foliolo de la hoja. Por lo que definitivamente queda comprobado que los materiales identificados en la presente caracterización confirman la clasificación hecha por Sørensen (1996).

Los índices de heredabilidad fueron relativamente altos para un alto porcentaje de los caracteres relacionados con prácticamente todas las partes de la planta, destacándose el número de días a la floración y días a la madurez fisiológica de la vaina; longitud del tallo principal y la relación L/A del foliolo de la hoja, lo cual sugiere que la expresión fenotípica de estos caracteres es una buena indicación de su mérito genético. El único carácter con altos valores de heredabilidad encontrados en esta investigación y en la realizada por Márquez (1992) en *P. erosus*, fue la longitud del tallo principal. A pesar de pertenecer al mismo género, se nota que los caracteres con altos índices de heredabilidad son diferentes en las dos especies, lo cual indica que tienen distintos patrones genéticos posiblemente por la distancia geográfica que les separa, lo cual a producido una evolución filogenética diferente..

## 5.2. Fase de laboratorio

La elección del estado fisiológico del material vegetal para la extracción del ADN en esta especie, no representó un impedimento en el aislamiento del ADN, es decir, no hubo grandes diferencias en la cantidad de ADN extraído de hojas jóvenes frescas (mejor estado) o de hojas adultas congeladas, lo cual representa una gran ventaja ya que muchas veces los sitios de recolección del material son distantes al laboratorio y la única posibilidad es traer muestras liofilizadas o congeladas.

La distribución de los individuos observados en el dendograma muestra tres grupos en concordancia a la clasificación morfoetnobotánica hecha por Sørensen (1996), es decir, chuines, ashipas y jíquimas, además dos individuos que son los más divergentes de los otros tres grupos, las ashipas TC118 y TC525. Esto a parte de ser coherente, muestra claramente que la técnica de RAPDs y los métodos analíticos usados, son herramientas poderosas para la caracterización de germoplasma.

Dentro de la colección de *P. tuberosus* se observó una interesante diversidad geográfica, ratificando el endemismo de las entradas pertenecientes a los chuines y las jíquimas que presentan pequeñas variaciones en su patrón genético, lo cual puede ser el resultado de una

única introducción en las zonas de la Amazonia peruana y en la costa pacífica ecuatoriana respectivamente, desde las comunidades vecinas. (Sørensen *et al*, 1997). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la caracterización morfológica realizada en este estudio. El grupo de las ashipas indiscutiblemente se muestra como el más diverso geográficamente con materiales cultivados de Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia, llevando a pensar que pudo haber un flujo de germoplasma a lo largo de los ríos que conforman la Amazonia y el intercambio de germoplasma en los últimos años entre colectores, bancos de semillas y comunidades indígenas (Sørensen, comun. personal).

Las distancias genéticas pequeñas entre los grupos, según el dendograma, el "bootstrap", el análisis canónico discriminante y el análisis de correspondencia indican que la colección tiene mucha similitud genética entre los chuines (grupo 2), jíquimas (grupo 1) y ashipas (grupo 3), lo cual es razonable si consideramos que estamos evaluando variabilidad genética dentro de una misma especie; en cambio, el grupo 4 es genéticamente mucho más diferente que los tres grupos en mención ya que se puede de tratar de una hibridación de *P. tuberosus* x *P. erosus*. (Sørensen, comun. personal).

La técnica RAPD contribuyó en la investigación a una mejor caracterización de la colección y a la detección de posibles duplicados (ver resultados). Se detectó errores de etiquetado en las entradas TC550, TC352 y TC538, lo cual es reforzado con los resultados morfológicos. Además, la entrada TC553A que se había agrupado como una ashipa en el fenograma morfológico, en la caracterización molecular se agrupó como una jíquima, lo cual permite por medio de esta técnica asignar la correcta ubicación de este material. Otra de las ventajas de los marcadores moleculares que contribuyeron en el presente estudio fue como se dijo anteriormente la posible identificación de dos materiales (TC118 y TC525) como posibles híbridos entre *P. tuberosus* y *P. erosus* producto de ciertas multiplicaciones realizadas en conjunto de materiales de las dos especies (Sørensen, comun. personal). Además, se logró por medio de esta técnica la verdadera reubicación de ciertos materiales en la evaluación

morfológica se habían ubicado como un cuarto grupo y que verdaderamente están inmersos dentro del grupo 1 de las ashipas.

### 5.3 Relación entre los marcadores morfológicos y moleculares

Los procedimientos usados permitieron relacionar los grupos de datos moleculares y morfológicos y permiten inferir la presencia de relaciones estadísticas significativas, lo cual es fuertemente ratificado por los resultados obtenidos y discutidos en los párrafos anteriores. Es decir, este mecanismo ayuda a corroborar que los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y molecular fueron muy coherentes y similares como se puede verificar en los grupos que se formaron y que son bien expresados mediante los fenogramas, dendogramas y la graficación del análisis discriminante canónico. En otras investigaciones realizadas en la década de los 80 y 90 como la que Autrique *et al* (1996), obtuvieron una correlación significativa entre RFLP basados en distancias genéticas y distancias basadas en 16 caracteres morfológicos y agronómicos en trigo duro. Beer *et al* (1993) no obtuvieron diferencias significativas en avena entre marcadores RFLP y características morfológicas; y, por el contrario, Schut *et al* (1997) trabajando en cebada, encontraron relaciones bajas entre los marcadores AFLP y los caracteres morfológicos.

En torno a lo anterior se suscita la pregunta que si existe una correlación significativa entre los dos grupos de datos, entonces, sería conveniente realizar la caracterización de una de las dos formas, molecular o morfológica?. Esta interrogante ayuda nuevamente a confirmar el aporte de los caracteres moleculares en la evaluación de germoplasma e indica también que ciertos caracteres morfológicos juegan un papel fundamental para la caracterización de germoplasma y el mejoramiento del cultivo, principalmente aquellos menos influenciados por el medioambiente y efectos epistáticos, como son los caracteres cualitativos.

Es así, que los caracteres cualitativos demostraron ser los de mayor aporte para la obtención de una mejor relación entre los grupos de datos en estudio, observándose que los más discriminantes aportan valores altos de correlación, pero que también el resto de

caracteres cualitativos juegan un papel importante en esta relación, es así, que fueron los que obtuvieron los mayores valores de correlación. Por supuesto, hay que tomar en cuenta que los más discriminantes fueron solamente diez caracteres, en cambio, los menos discriminantes fueron el doble, lo cual confirma que los caracteres que ayudan a diferenciar de mejor manera entre grupos morfológicos tienen un aporte sobresaliente en la relación con los caracteres moleculares, posiblemente porque son menos influenciados por el medio ambiente.

Esto no sucede con los cuantitativos que tienen más influencia de factores ambientales, y tuvieron correlaciones muy bajas cuando fueron analizados en forma separada los más discriminantes y el resto de los descriptores, lo cual indica que para que exista una mayor relación entre las distancias de los dos grupos de datos es necesario que se analicen todos los caracteres cuantitativos con lo cual se logra correlaciones significativas.

Al disminuir el número de polimorfismos de 32 a 25, para obtener aquellos que más aportan en la diferenciación genética de los grupos, se detectó coeficientes de correlación menores que con el uso de todos los polimorfismos. Esto lleva a ratificar que las bandas polimórficas excluidas juegan un papel fundamental en la relación de los grupos ya que aportan información adicional básica para la diferenciación de los grupos.

Las ventajas de la caracterización morfológica, permitió ampliar los conocimientos de la variabilidad genética del género, facilitando así la identificación de materiales con características deseables como son alta producción, además de otras características taxonómicas de utilidad como por ejemplo, el hábito de crecimiento y vigor de la planta, útiles para los programas de mejoramiento. Por otro lado, los marcadores RAPD's lograron evaluar en forma precisa la variabilidad de *P. tuberosus*, ubicar correctamente a los materiales, identificar duplicados y errores de etiquetado de las entradas, lo cual favorece notablemente la elaboración y uso de datos pasaporte y caracterización de germoplasma y conocer en forma veraz el potencial de un genotipo. Las correlaciones significativas encontradas entre los dos grupos de datos ayudan a ratificar la importancia de la utilización y la complementariedad de la caracterización morfológica y molecular.

## 6. CONCLUSIONES

### 6.1. Fase de campo

- Las distancias de Gower (1967) y el agrupamiento de Ward (1963) permite definir cuatro grupos jerárquicos: las ashipas (grupo 1 y 4), chuines (grupo 2) y jíquimas (grupo 3) que se asemeja a la clasificación realizada por Sørensen (1996).
- Los caracteres cualitativos más discriminantes son, en orden de importancia: forma y tipo del lóbulo del foliolo central de la hoja, color de la pulpa de la raíz, forma de la semilla, velocidad de crecimiento del tallo principal, color de los sépalos de la flor, color del tallo, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, color de la vaina inmadura.
- Los caracteres cuantitativos que mayor discriminan son: número de días a la floración, número de días a la madurez fisiológica de la vaina, ancho y la relación L/A del foliolo principal de la hoja y ancho de la vaina. Esto expresa la importancia que tienen todas las partes de la planta en la clasificación de la especie en estudio.
- Los caracteres cualitativos que separan entradas dentro de cada grupo, coincidieron en la mayoría de los descriptores con los que separan entre grupos, identificándose a la forma y tipo de lóbulo central del foliolo de la hoja, color de la vaina inmadura y curvatura de la vaina, como los caracteres más útiles para separar entradas dentro de grupos.
- Los caracteres cuantitativos que diferencian entre entradas son: relación L/A de la raíz, relación L/A del foliolo principal de la hoja, días a la madurez fisiológica, días a la floración y largo de estambres.

- Con base en los resultados obtenidos para los caracteres cualitativos y cuantitativos entre entradas y entre grupos, se afirma que existe mayor variabilidad genética entre los cuatro grupos conformados que entre entradas dentro de cada grupo.
- Algunos de los caracteres coinciden con los identificados como de alto valor discriminante en *P. erosus*, por lo que pueden ser usados en ambas especies y quizás para caracterizar a todo el género. Estos caracteres son: hábito de crecimiento, forma del lóbulo central del foliolo de la hoja, velocidad de crecimiento del tallo principal y número de días a la floración.
- La caracterización morfológica y la estructura de los agrupamientos, establecen que el agrupamiento 1 y 4 denominadas ashipas se caracterizan por contener entradas con la mayor diversidad geográfica y variabilidad genética en caracteres de la hoja, raíz, flor proveniente de Brasil, Bolivia, Ecuador y Perú. El agrupamiento 2 (chuines) contiene entradas endémicas de la Amazonia peruana, conteniendo entradas morfológicamente muy parecidas por estar restringidas a una menor área geográfica, diferenciándose entre ellas por caracteres principalmente de la raíz. De igual forma, el agrupamiento 3 (jíquimas) se conforma solamente con materiales provenientes de la costa pacífica de Ecuador, con un hábito de crecimiento arbustivo y alta precocidad, característico de este grupo.
- Las ashipas de los grupos 1 y 4 presentan pequeñas distancias entre sí, es decir, son similares morfológicamente. El mayor grado de disimilitud o grupos más separados fenotípicamente corresponde al grupo 1 con el grupo 2 de los chuines. El grupo 3 de las jíquimas tiene más similitud con las ashipas (grupo 1 y 4), manteniéndose el grupo de los chuines como el más distante a los tres grupos.
- La muestra mínima para la caracterización de germoplasma de *P. tuberosus* para los descriptores cualitativos es de 1 a 3 repeticiones para lograr obtener una buena estimación de estos caracteres monogénicos.

- Para los caracteres cuantitativos con una muestra mínima adecuada, se identifica a la relación L/A del foliolo principal de la hoja, días a la madurez fisiológica de la vaina, número de días a la floración, longitud de la flor, ancho del estandarte, número de inflorescencia por rama, largo de los estambres, longitud y número de nudos del tallo principal, ancho del foliolo principal de la hoja, número de hojas por planta, relación L/A de la raíz tuberosa, ancho de la vaina, relación L/A de la vaina y porcentaje de materia seca de la raíz.
- Los caracteres con tamaño de muestra altos pero de importancia comercial son: número de ramas por planta, número de ramas con inflorescencia, número de botones florales por inflorescencia, largo, ancho, número y peso de la raíz, número de vainas, largo, ancho, número y peso de semilla,
- La menor variación en los caracteres cuantitativos se dan para la longitud de la flor, ancho del estandarte, relación L/A del foliolo de la hoja y días a la madurez fisiológica
- Los promedios que mejor diferencian para caracteres cuantitativos por grupos de entradas, según la clasificación de Sørensen (1996), son: días a la floración, largo de la flor, ancho del estandarte la flor, número de botones florales por inflorescencia, largo de los estambres, largo del tallo principal, número de ramas con inflorescencia, ancho del foliolo principal de la hoja, relación L/A de la hoja y días a la madurez fisiológica.
- Estos descriptores cuantitativos comparados con los que más discriminan del análisis multivariado, coinciden en días a la floración y a la madurez fisiológica de la vaina y la relación L/A del foliolo de la hoja. Por lo que definitivamente los materiales identificados en la presente caracterización confirman la clasificación hecha por Sørensen

- Los altos valores de heredabilidad sugieren que la expresión fenotípica es una buena indicación de su patrón genético, identificándose el número de días a la floración, madurez fisiológica de la vaina; longitud del tallo principal y la relación L/A del foliolo de la hoja, con los índices más altos de heredabilidad.

## 6.2. Fase de laboratorio

- El método de extracción CTAB es efectivo para obtener ADN en la cantidad y calidad requerida para el análisis RAPD. No hay mayor diferencia en cuanto al tipo de material usado (hoja joven, hoja adulta; hoja fresca, hoja congelada), pero si hay pequeñas diferencias en cuanto al genotipo.
- La caracterización molecular permite diferenciar cuatro grupos denominados jíquimas, chuines, ashipas y dos entradas de posibles híbridos entre *P. tuberosus* y *erosus*; con distancias genéticas pequeñas entre los tres primeros y grandes con los híbridos. Esto claramente muestra que la técnica de RAPDs y los métodos analíticos usados son herramientas poderosas para que, en unión con los análisis morfológicos, complementar la caracterización de germoplasma.
- Se identifica las siguientes bandas polimórficas o marcadores que tienen el mayor aporte para diferenciar entre grupos y por lo tanto caracterizar los individuos: OPA3, OPA5, OPA13, OPH8, OPH15, UBC72, UBC101, y UBC535.
- La técnica RAPD contribuye en la investigación a una mejor caracterización de la colección y a la detección de posibles duplicados como: TC210 (ashipa-Bolivia) y TC352 (Perú); TC353 y TC354 (chuines-Perú); TC353, TC354 con TC359 (chuin-Perú); TC355 con TC361, TC362 (chuines-Perú); TC361 y TC362 (chuines-Perú); TC353, TC354, TC359 con TC554C (chuines-Perú). La entrada TC554N y TC555 (jíquima-Ecuador); TC554N, TC555 con TC551 (jíquima-Ecuador). Además se detecta errores de etiquetado en las entradas TC550, TC352 y TC538, lo cual es reforzado con los resultados morfológicos.

- El análisis “bootstrap” presenta el brazo que forma los tres grupos (ashipas, chuines y jíquimas). fuertemente constituido con un valor de 85%. Al igual que el brazo que conforma las entradas del grupo de los chuines, con un valor de 90%.
- Además este análisis identifica los siguientes subgrupos fuertemente conformados: las entradas constituidas por la TC525 y TC118; TC538 y TC238; TC353 y TC354 con valores de 100%.

### **6.3 Relación de los marcadores morfológicos y moleculares**

- El método de comparación de matrices de distancia mediante el programa MXCOMP del paquete estadístico ntsys-pc es eficiente para comparar los grupos de datos morfológicos y moleculares. La comparación de estas matrices de distancias permite encontrar una relación altamente significativa, lo cual indica un alto grado de concordancia, que se observa en la similitud de la formación de grupos expresados mediante los fenogramas, dendogramas y la graficación del análisis discriminante canónico
- Los caracteres cualitativos son los que más aportaron para la obtención de valores de correlación significativos, al contrario de los caracteres cuantitativos que presentan valores bajos de correlación.
- Las correlaciones significativas indican claramente la complementariedad en el estudio de los marcadores morfológicos principalmente los cualitativos y los marcadores RAPDs para la evaluación de germoplasma.

## 7. RECOMENDACIONES

- Se recomienda utilizar en futuras caracterizaciones de *P. tuberosus* los siguientes caracteres: forma y tipo del lóbulo del foliolo central de la hoja, color de la pulpa de la raíz, forma de la semilla, velocidad de crecimiento del tallo principal, color de los sépalos de la flor, color del tallo, hábito de crecimiento, curvatura de la vaina, color de la vaina inmadura, número de días a la floración, número de días a la madurez fisiológica de la vaina, ancho y la relación L/A del foliolo principal de la hoja y ancho de la vaina.
- Para la evaluación de la variabilidad genética de las especies del género *Pachyrhizus* se puede utilizar caracteres que han coincidido como los más discriminantes para *P. erosus* y *P. tuberosus*. Estos descriptores son: hábito de crecimiento, forma del lóbulo central del foliolo de la hoja, velocidad de crecimiento del tallo principal y número de días a la floración.
- Considerando los costos y tiempo que demanda realizar una caracterización morfológica, se recomienda elegir un tamaño de muestra práctico pero al mismo tiempo que refleje una buena estimación del carácter que se está midiendo ya que existen algunos caracteres que necesariamente tendría que registrarse el número de mediciones que se indica a una precisión del 5 o 10% en los resultados, para no ocasionar una mala estimación del potencial de la colección.
- Por lo tanto se recomienda utilizar los caracteres que además de ser buenos discriminantes, no necesitan ser muestreados en gran cantidad. Estos son: número de días a la floración, longitud de la flor, ancho del estandarte, número de inflorescencia por rama, largo de los estambres, longitud y número de nudos del tallo principal, ancho del foliolo principal de la hoja, relación L/A del foliolo principal de la hoja número de hojas por planta, relación L/A de la raíz tuberosa, días a la madurez fisiológica de la vaina ancho de la vaina, relación L/A de la vaina, porcentaje de materia seca de la raíz.

- Dada la facilidad de extracción y amplificación de ADN, al igual que los costos relativamente bajos, se puede afirmar que la técnica de aislamiento y RAPDs son adecuadas para la caracterización de germoplasma en países con recursos limitados y en colecciones que no tenga una estrecha variabilidad genética.
- Es importante para futuras investigaciones no solamente en esta especie sino en otras de importancia, obtener una mayor cantidad de polimorfismos, lo cual proporcionaría un mejor conocimiento de la variabilidad genética inmersa en la especie en estudio.

## 8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, E. 1972. Consensus techniques and the comparison of taxonomic trees. *Syst. Zool.* 21:390-397
- ANDERBERG, M.R. 1973. Cluster analysis for applications. New York, Academic Press. 361 p.
- APPLIED BIOSTATISTICS INC., 1994. NTSYS-pc manual. Exeter Software, Setauket, NY. 206 p.
- ARRUDA, B. 1921. Cultura e produção do Jacatupé. *Chácaras e Quintais (São Paulo)* 23:463-464.
- AUTRIQUE, E.; NACHIT, M.; MONNEVEUX, P.; TANKSLEY, S.; SORRELLS, M. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. *Crop Science* 36:735-742
- BEER, S.; GOFFREDA, T.; PHILLIPS, J.; MURPHY; SORRELLS, M. 1993. Assessment of genetic variation in *Avena sterilis* using morphological traits, isozymes, and RFLPs. *Crop Science* 33:1386-1393
- BREURE, A. 1996. Gene mapping tops profit predictions. *The Agbiotech Bulletin.* 4:23
- BRITISH COLOUR COUNCIL AND ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY. 1940. Horticultural colour chart. London. s.p.
- CAETANO-ANOLLIS, G. 1993. Amplifying DNA with arbitrary oligonucleotide primers. *In* PCR Methods and Applications, (cold spring Harbor Lab. Press ISSN):85-94
- CASE, S. 1978. Biochemical systematics of members of the genus *Rana* native to western North America. *Syst. Zool.* 27:299-311
- CHANTELL, C. 1970. Upper Pliocene frogs from Idaho. *Copeia* 1970:654-664
- CLAUSEN, R.T. 1945. A botanical study of the yam beans (*Pachyrrhizus*). *Memoir of the Cornell University Agricultural Experimental Station* 264: 1-38 p.
- CLEGG, M. 1993. Chloroplast gene sequences and the study plant evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:363-367
- COCHRAN, W. 1954. Some methods for strengthening the common  $X^2$  tests. *Biometrics* 10:417-451

- CRICI, J.V.; LÓPEZ, M.F. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Washington, D.C., Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos. 132 p.
- DRAGON, E. 1993. Handling reagents in the PCR laboratory. Suplemento de Cold Spring Harbor Laboratory, PCR Methods and Applications 3:58-59
- DUKE, J.A. 1981. Handbook of legumes of world economic importance. New York and London, Plenum. pp.182-185.
- DUQUE, C. 1998. Métodos estadísticos aplicados en biología molecular. *In*: Curso superior de capacitación: métodos estadísticos para el análisis de datos en biología molecular. Universidad Nacional Costa Rica, CIAT. 1998. s.p.
- DUNCAN, D. 1975. T-Tests and interval's for comparisons suggested by the data. *Biometrics* 31:339-359
- EDWARDS, A.; JOHNSTONE, C.; THOMPSON, C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic ADN for PCR analysis. *Nucl. Acids Res.* 19:1349
- EFRON, B, TIBSHIRANI, R. 1993. An introduction to the bootstrap. Chapman and Hall, New York. s.p.
- ENGELS, J.M.M. 1983a. A systematic description of cacao clones. 1. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* (Holanda) 32:377-385
- 1983b. A systematic descripción of cacao clones. *In* The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* (Holanda) 32:387-396
- ENRÍQUEZ, G. 1966. Selección y estudio de las características de la flor, la hoja y la mazorca, útiles paa la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis. Ma. Sci. Turrialba, Costa Rica. IICA. 97 p.
- 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. *In* Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales. Castillo, R. Estrella, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. pp. 116-160
- ✓ ERLICH, H.A., ed. 1989. PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification. New York, Stockton. 246 p.
- ESTRELLA, J.; PHILLIPS, S.; ABBOTT, R.; GILLIES, A. AND SØRENSEN, M. 1996. Genetic variation and relationships in agronomically important species of yam bean (*Pachyrhizus*) based on RAPD markers. *In*: Proceedings of the Second International Symposium on Tuberous Legumes, Celaya - Mexico. s.p.

- FALCONER, D. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman, New York. s.p.
- FARRIS, J.; KLUGE, A.; MICKEVICH, M. 1980. Paraphyly of the *Rana boylei* group. Syst. Zool. 28:627-634
- FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39:783-791
- FIENBERG, S. 1977. The analysis of cross-classified data. Cambridge, MA: MIT Press
- GOWER, J. 1967. A comparison of some methods of cluster analysis. Biometrics 23:623-637
- GREEN, D. 1986. Systematics and evolution of western North American frogs allied to *Rana aurora* and *Rana boylei*: Electrophoretic evidence. Syst. Zool. 35:283-296
- GRUM, M., 1990. Breeding *Pachyrrhizus erosus* Rich. ex DC.: A review of goals and methods. Copenhagen, Denmark. Department of Crop Husbandry and Plant Breeding. The Royal Veterinary and Agricultural University. 75 p.  
También en: Second Annual Progress Report of the Yam Bean Project. The Yam Bean Project, Copenhagen, Denmark. P. 152-229
- HAMON, S.; DUSSERT, S.; NOIROT, M.; ANTHONY, F.; HODGKIN, T. 1995. Core collections - accomplishments and challenges. Plant Breeding Abstracts 65(8):1126-1133
- HARTI, D. 1980. Principles of population genetics. Sinauer Associates, Sunderland, MA. s.p.
- HARRIS, S.A. 1996. Molecular analysis of forest tree biodiversity: a selection of practical protocols. Oxford, England. 47 p.
- HILLIS, D. 1985. Evolutionary genetics and systematics of New World frogs of the genus *Rana*: An analysis of ribosomal DNA, alloenzymes, and morphology. PhD Thesis. Univ. Kans., Lawrence. 304 pp.
- , 1987. Molecular versus morphological approaches to systematics. Annual Review of Ecological and Systematics 18:23
- ; DAVIS, S. 1986. Evolution of ribosomal DNA: Fifty millions years of recorded history in the frog genus *Rana*: Evolution 40:1275-1288
- ; MORITZ, C. 1990. Molecular Systematics. Sinauer Associates, Sunderland, MA. s.p.

- HOEHNE, F.C. 1938. Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Bol. Agricultura 39:753-756
- HUBERT, L. 1983. Inference procedures for the evaluation and comparison of proximity matrices. p. 209-228. In Felsenstein, J. (ed.) Numerical taxonomy. NATO ASI series, Vol. G1. Springer-Verlag, Berlin. s.p.
- IPGRI. 1995. Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of IPGRI Workshop, Roma Italy, 9-11 October. Eds. W. Ayad; T. Hodgkin; A. Janadat; V. Rao. 137 p.
- KARP, A.; SKRESOVICH; BHAT, K.; AYAD, W.; HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin, No. 2. 47 p.
- KENDALL, M.; STUART, A. 1979. The advanced theory of statistics. Volumen 2, New York: Macmillan Publishing Company, Inc. s.p.
- KWOK, S; HIGUCHI, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. Nature 339:237-238
- LEAKEY, C.L. 1988. Genotypic and phenotypic markers in common bean. Genetic resources of *Phaseolus* beans. In: Paul Gets Ed. Dordrecht, Holland. Kluwer Academic Publishers. p. 245-327
- LEFEBVRE, V.; CHÈVRE, A. 1995. Tools for marking plant disease and pest resistance genes: a review. Agronomie 15:3-19
- LEFORT-BUSSON, M.; DE VIENNE, D. 1985. Les distances génétique. Versailles, France. INRA. s.p.
- LEÓN, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. 1a edición. San José, Costa Rica, IICA. 445 p.
- © LEÓN, O. 1998. Marcadores moleculares: principales tipos, bases moleculares, ventajas y limitaciones. In Uso de los marcadores moleculares en la genética y la selección de las plantas. Eds. M. Cordine; H. Olivares; D. Planas. Habana, Cuba. pp 1-18.
- LEPAGE, H.S.; GIANOTTI, O.; ORLANDO, A. 1946. Toxides dos constituintes des sementes de *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. var. *vermelha*, para o afídeo *Brevicoryne brassicae* L. (Homoptera-aphidea). Arch. Inst. Biol. (São Paulo) 17:249-258

- LÓPEZ, A.J. 1991. Descripción sistemática y parámetros genéticos para características cualitativas y cuantitativas en la colección de batata *Ipomoea batatas* (L.) Lam. del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, Costa Rica. 128 p.
- ≡ LOWE, A.; HANOTTE, O.; GUARINO, L. 1996. Standardization of molecular genetic techniques for the characterization of germplasm collections: the case of random amplified polymorphic DNA (RAPD). *Plant Genetic Resources Newsletter* 107:50-54.
- ≡ MANTEL, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220
- MARGUSH, T.; MCMORRIS, F. 1981. Consensus n-trees. *Bull. Math. Biol.* 43:239-244
- MÁRQUEZ, J.M. 1992. Caracterización sistemática, parámetros genéticos e índices de selección de la colección de jicama (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) del CATIE. Tesis Mag.Sc., Turrialba, Costa Rica. CATIE. 142 p.
- ≡ MARTÍNEZ, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. *In Agronomía Colombiana* XII:1, 66-71
- MENEZES, O.B. de; OLIVEIRA NUNES, W. de. 1955. Esterilidade em jacutupé (*Pachyrhizus bulbosus* L.). *Revista Ceres (Brazil)* 10:52-57
- MIYAMOTO, M. 1985. Consensus cladograms and general classifications. *Cladistics* 1:186-189
- MORERA, J. 1981. Descripción sistemática de la colección de Panamá de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) del CATIE. Tesis M. Sc. CATIE, Turrialba, Costa Rica. 122 p.
- 1992. Rejuvenecimiento, caracterización, evaluación y utilización de jicama en CATIE-Costa Rica. *International Symposium on Tuber Legumes*, 1o, Guadeloupe, Proceedings. Resumen en Inglés: Sorensen, M., ed. 1993. *Scientific Report of the Yam Bean Project*. Copenhagen, Denmark. pp.189-206.
- MUNTHALI, M.; FORD-LLOYD, B.; NEWBURY, H. 1992. The random amplification of polymorphic DNA for fingerprinting plants. *PCR Methods Appl.* 1:274-276
- NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES. 1979. Root Crops: Yam Bean. *In Tropical Legumes: Resources for the future*. Washington, USA. pp.21-27.
- ⊖ NEI, M.; LI, W. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:5269-5273

- NELSON, G. 1979. Cladistic analysis and synthesis: Principles and definitions, with a historical note on Adanson's. *Familles des Plantes (1763-1764)*. *Syst. Zool.* 28:1-21
- ; PLATNICK, N. 1981. *Systematics and Biogeography: Cladistics and Vicariance*. New York. Columbia Univ. Press.
- PANKHURST, R.J. 1978. *Biological identification, the principles and practice of identification methods in biology*. Edward Arnold. London. 104 p.
- PATWARY, M.; MACKAY, R.; VAN DER MEER, J. 1993. Revealing genetic markers in *Gelidium vagum* (Rhodophyta) through the random amplified polymorphic DNA (RAPD) techniques. *J. Phycol.* 29:216-222.
- PECKOLT, T. 1880. Jacutupé. *Zeitschrift der allgemeine österreichische Apotheker Vereines* 13: 193-7 y 14: 209-13.
- PECKOLT, G. 1922. Jacutupé. *Chácaras & Quintais* 25, 187-9 and 25, 275-6.
- PEETERS, J.P.; MARTINELLI, J..A. 1989. Hierarchical cluster analysis as a tool to manage variation in germplasm collections. *Theor. Appl. Genet.* 78:42-48
- PENNY, D.; FOULDS, L.; HENDY, M. 1982. Testing de theory of evolution of comparing phylogenetic trees constructed from five different protein sequences. *Nature* 297:197-200.
- PHILLIPS, W.; RODRÍGUEZ, H.; FRITZ, P. 1995. *Marcadores de ADN: Teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo. Con ejemplos de investigaciones en cacao (Theobroma cacao)*. Unidad de Biotecnología, CATIE, Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- POUND, J.F. 1932. The genetic constitution of the cacao crop. *In* Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad. *Annual Report on Cacao Research* 2:27-29
- POWELL, W. 1992. Plant genomes, gene markers and linkage maps. *In* Moss, J.P., ed. *Biotechnology and crop improvement in Asia*. Patancheru, India, International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. pp. 297-322
- RAO, R.; RILEY, K. 1994. The use of biotechnology for conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Genetic Resources Newsletter* 97: 3-19
- SAIKI, R.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K.; HORN, G.; ERLICH, H.; ARNHEIM, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnostic of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354

- ; GELFAND, D.; STOFFEL, S.; SCHAT, S.; HIGUCHI, R.; HORN, G.; MULLIS, K.; ERLICH, H. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Nature (London)* 239:487-497
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual. Segunda Edición.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York. Sobral, B.W.S. and Honeycutt, R. 1993. High output genetic mapping of polyploids using PCR-generated markers. *Theor. Appl. Genet.* 86:105-112
- SCHUT, J.; QI, X.; STAM, P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet* 95:1161-1168
- SNEATH, H.F., SOKAL, R.R. 1973. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification.* Eds. D. Kennedy; R.B. Park. San Francisco, W.H. Freeman. 573 p.
- SØRENSEN, M. 1988. A taxonomic revision of the genus *Pachyrhizus* (Fabaceae-Phaseoleae). *Nordic Journal of Botany* 8(2):167-192
- 1990. Observaciones on distribution, ecology and cultivation of the tuber-bearing legume genus *Pachyrhizus* Rich. ex DC. Wageningen Agricultural University Papers (Netherlands) 90(3):38
- 1996. Yam bean, *Pachyrhizus* DC. IPGRI, Roma, Italia. 141 p.
- ; GRUNEBERG, W., ØRTING, B.; 1996. Genetic Resources of Ahipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi). n.p. 51 p.
- ; DØYGAARD, S.; ESTRELLA, J.; KVIST, L.; NIELSEN, P. 1997. Status of the South American tuberous legume *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. *Biodiversity and Conservation* 6:1581-1625
- STEEL, G.; TORRIE, J. 1980. *Principles and procedures of statistics: A biometrics approach.* McGraw-Hill, New York. s.p.
- TABA, S. 1991. Caracterización y evaluación de germoplasma de maíz. *In Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales.* Castillo, R. Estrela, J. Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. pp. 161-166
- TANKSLEY, S.D. 1993. Mapping Polygenes. *Ann. Rev. Genet.* 27:205-233
- VIETMEYER, N.D. 1986. Lesser-known plants of potential use in agriculture and forestry. *Science (USA)* 232:1379-1384

- WARD, Jr. J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association* (EEUU) 58:236-244
- WAUGH, R.; POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends in Biotechnology* 186-192
- WEIR, B. 1990. *Genetic data analysis*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. s.p.
- WEISING, K.; NYBOM, K.; WOLFF; MEYER, W. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*. CRC Press, Inc. London.
- WELSCH, J.; MCCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218
- ; ----- 1991. Genomic fingerprinting using arbitrarily primed PCR and a matrix of pairwise combinations of primers. *Nucl. Acids Res.* 19:5275-5279
- WETTON, J.; CARTER, R.; PARKIN, D.; WALTERS, D. 1987. Demographic study of a will house sparrow population by DNA fingerprinting. *Nature* (London) 327:147-149
- ≡ WILLIAMS, J.; KUBELIK, K.; LIVAK, K.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18:6231-6235
- ; HANAFEY, M.; RAFALSKI, J.; TINGEY, S. 1993. Genetic analysis using random amplified polymorphic markers. *Methods Enzymol.* 218:704-740
- WISHART, D. 1969. An algorithm for hierarchical classifications. *Biometrics* (EEUU) 22 (1):165-170
- WOLFF, K. 1988. Natural selection in *Plantago* species: a genetical analysis of ecologically relevant morphological variability, dissertation thesis. University of Groningen. The Netherlands.
- ⊖ -----; PETERS-VAN RIJN, J. 1993. Rapid detection of genetic variability in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflora* Tzvelev) using random primers. *Heredity* 71:335-341
- ⊖ YEH, F.; YANG, R.; BOYLE, T. 1997. PopGene version 1.21. Microsoft window-based freeware for population genetic analysis. A joint project development by Francis C. Yeh and Rang-Yang, University of Alberta and Tim Boyle, Centre for International Forestry Research

## **9. ANEXOS**

## Anexo 1

### Lista de descriptores cualitativos de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

#### Descripción de los caracteres cualitativos

Para los caracteres de color se utilizó la tabla de colores Horticultural Colour Chart (BRITISH COLOUR COUNCIL AND ROYAL HORTICULTURAL SOCIETY, 1940). Además las escalas de estos descriptores, se basan exclusivamente en los colores identificados en la colección.

#### Color de los estambres

- 1 Blanco

#### Color del estandarte de la flor

- 1 Blanco
- 2 Azul lobelia
- 3 Azul morisco

#### Color de las alas de la flor

- 1 Blanco
- 2 Azul lobelia
- 3 Azul morisco

#### Color de la quilla de la flor

- 1 Blanco
- 2 Azul lobelia
- 3 Azul morisco

#### Color de los sépalos de la flor

- 1 Amarillo sulfur
- 2 Marrón
- 3 Verde chicharo
- 4 Violeta victoria

### Pubescencia de los sépalos

0	Ausente
1	Muy rala
3	Rala
5	Moderada
7	Densa
9	Muy densa

### Presencia de floración

0	Ausente
1	Presente

### Hábito de crecimiento

Dato registrado en el período de llenado de vainas con base en la siguiente escala:

3	Arbustivo
5	Semi-arbustivo
7	Semi-trepador
9	Trepador

### Color del tallo

1	Verde lechuga
2	Verde lechuga más morado
3	Verde oscuro

### Velocidad del crecimiento del tallo principal

Registrada la longitud promedio alcanzado por el tallo principal a los 80 días después de la siembra, de acuerdo a la siguiente escala:

1	Muy lento (menor a 20 cm)
3	Lento (21-30 cm)
5	Intermedio (31-40 cm)
7	Rápido (41-50 cm)
9	Muy rápido (mayor de 50 cm)

### Pubescencia del tallo

Dato registrado en el ápice de los tallos durante el período de floración con la escala:

0	Ausente
1	Ralo
3	Moderado
5	Denso
7	Muy denso

### Longitud del entrenudo

Dato tomado en nudos de la parte central del tallo principal, cuyo promedio se registró con base en la siguiente escala:

1	Corto (menor de 6 cm)
3	Intermedio (6-8 cm)
5	Largo (8-10 cm)
7	Muy largo (mayor de 10 cm)

### Tipo de lóbulos en el foliolo central de la hoja

0	Ausente
1	Muy superficial
3	Superficiales
5	Moderados
7	Profundos
9	Muy profundos

### Forma del lóbulo central del foliolo principal

0	Ausente
1	Romboide
3	Oblongo
5	Oblongo-lanceolado
7	Lanceolado

### Color de la hoja madura

1	Verde espinaca
2	Verde hiedra

### Color de la peridermis de la raíz tuberosa

- 1 Amarillo crema
- 2 Amarillo mimosa
- 3 Amarillo pajizo
- 4 Ocre amarillo
- 5 Verde salvia

### Defectos de la superficie de la raíz tuberosa

- 0 Ausente
- 1 Constrictiones superficiales
- 2 Constrictiones profundas
- 3 Hendiduras superficiales
- 4 Hendiduras profundas
- 5 Constrictiones y hendiduras superficiales
- 6 Constrictiones y hendiduras profundas

### Forma de la raíz tuberosa

- 1 Esférica
- 2 Lobulada
- 3 Globulada
- 4 Cilíndrica
- 5 Redonda-achatada
- 6 Irregular
- 7 Alargada irregular
- 8 Trompo
- 9 Globulada trompo

### Dureza de la pulpa de la raíz

- 1 Muy suave
- 3 Suave
- 5 Dura
- 7 Muy dura

### Color de la pulpa de la raíz

- 1 Amarillo imperial
- 2 Amarillo mimosa
- 3 Amarillo pajizo
- 4 Blanco
- 5 Blanco + morado

### Agrietamiento de las raíces

- |   |          |
|---|----------|
| 0 | Ausente  |
| 1 | Presente |

### Color de la vaina inmadura

- |   |                |
|---|----------------|
| 1 | Verde lechuga  |
| 2 | Verde chicharo |

### Color de la vaina en su madurez fisiológica

- |   |                     |
|---|---------------------|
| 1 | Amarillo de prinula |
| 2 | Marrón              |
| 3 | Negro               |

### Curvatura de la vaina

- |   |                        |
|---|------------------------|
| 1 | Recta                  |
| 3 | Ligeramente curvada    |
| 5 | Medianamente curvada   |
| 7 | La mayor parte curvada |

### Intensidad de la constricción de la vaina

Dato tomado a la madurez fisiológica en la siguiente escala:

- |   |             |
|---|-------------|
| 3 | Superficial |
| 5 | Intermedia  |
| 7 | Profunda    |

### Dehiscencia de la vaina madura

Describe la abertura de vainas en el campo al momento de su madurez

- |   |          |
|---|----------|
| 0 | Ausente  |
| 1 | Presente |

### Color de la semilla

- |   |                    |
|---|--------------------|
| 1 | Moreno rojizo      |
| 2 | Naranja de Mars    |
| 3 | Negro              |
| 4 | Negro con amarillo |
| 5 | Rojo zanahoria     |

### Brillo de la semilla

3	Opaco
5	Intermedio
7	Brillante

### Forma de la semilla

1	Aplanada
2	Dentada
3	Redondeada
4	Cilíndrico
5	Semiaplanada

### Susceptibilidad a la presencia de virus

Dato tomado a la floración de acuerdo a la siguiente escala:

1	Susceptible
3	Medianamente susceptible
5	Tolerante

## ANEXO 2

### Lista de descriptores cuantitativos en *P. tuberosus*. CATIE, 1998

CARACTER	DESCRIPCIÓN
<u>Número de días a la floración</u>	Número de días desde la siembra hasta que el 50% de las plantas hayan florecido
<u>Longitud de la flor (mm)</u>	Medición desde la inserción de los sépalos con el pedúnculo hacia el ápice del estandarte. Promedio de 30 flores seleccionadas al azar por entrada
<u>Ancho del estandarte de la flor (mm)</u>	Promedio de 30 flores seleccionadas al azar/entrada
<u>Número de ramas/planta</u>	Dato registrado en la floración en 35 plantas/entrada
<u>Número de ramas con inflorescencia</u>	Dato registrado en la floración en 35 plantas/entrada
<u>Número de inflorescencias por rama</u>	Dato registrado en la floración en 35 plantas/entrada
<u>Número de botones florales/inflorescencia</u>	Dato registrado en la floración en 35 plantas/entrada
<u>Número de estambres</u>	Promedio de 30 flores seleccionadas al azar/entrada
<u>Largo de los estambres</u>	Promedio de 30 flores seleccionadas al azar/entrada
<u>Longitud del tallo principal de la planta</u>	Promedio del tallo más largo en cm al momento de la cosecha de los raíces. 35 plantas/entrada
<u>Número de nudos del tallo principal</u>	Promedio registrado de 35 plantas/entrada, al momento de la cosecha de las raíces tuberosas
<u>Longitud del foliolo principal de la hoja</u>	En cm con un flexómetro en la floración.
<u>Ancho del foliolo principal de la hoja</u>	En cm con un flexómetro en la floración.
<u>Relación largo/ancho del foliolo principal de la hoja</u>	
<u>Número de hojas por planta</u>	Registrado a madurez fisiológica. Promedio 35 plantas
<u>Ancho de la raíz tuberosa</u>	Registrado en cm a la cosecha. Promedio de 35 plantas
<u>Longitud de la raíz tuberosa</u>	Registrado en cm a la cosecha. Promedio de 35 plantas
<u>Relación largo/diámetro de la raíz tuberosa</u>	
<u>Número de raíces tuberosas por planta</u>	A la cosecha. Promedio de 35 plantas

Continuación...

CARACTER	DESCRIPCIÓN
<u>Grosor de la corteza de la raíz</u>	Registrado a la cosecha en mm. Promedio 15 raíces tuberosas
<u>Rendimiento en fresco de raíces tuberosas</u>	A la cosecha en g/entrada. Promedio de 35 plantas
<u>Peso de raíz tuberosa/planta</u>	A la cosecha en g/35 plantas por entrada
<u>Porcentaje de raíces grandes (&gt;1000 g)</u>	Se registró calculando el porcentaje de raíces mayores a 1000 g del total de las 35 repeticiones.
<u>Porcentaje de raíces medianas (500-1000 g)</u>	Se registró calculando el porcentaje de raíces entre 500 y 1000 g del total de las 35 repeticiones.
<u>Porcentaje de raíces pequeñas (&lt;500 g)</u>	Se registró calculando el porcentaje de raíces menores a 500 g del total de las 35 repeticiones.
<u>Grados brix de la raíz tuberosa</u>	Expresa la cantidad de azúcares reductores en la pulpa como índice del sabor
<u>Porcentaje de materia seca de las raíces</u>	Registro del promedio de 35 muestras por entrada, que se fracciono y peso 100 g y se sometieron a secado en horno a 75°C durante 72 horas.
<u>Días a la madurez fisiológica de la vaina</u>	Días desde la siembra hasta la madurez fisiológica
<u>Longitud de la vaina</u>	En madurez fisiológica en cm. Promedio de 30 vainas.
<u>Diámetro de la vaina</u>	En madurez fisiológica en cm. Promedio de 30 vainas.
<u>Relación largo/diámetro de la vaina</u>	
<u>Número de vainas por planta</u>	En madurez fisiológica. Promedio de 30 vainas.
<u>Número de lóculos por vaina</u>	En madurez fisiológica. Promedio de 30 vainas.
<u>Porcentaje de plantas fértiles</u>	Registra la proporción de plantas con vainas respecto al total de la parcela, en la madurez.
<u>Número de semillas por vaina</u>	En madurez fisiológica. Promedio de 30 vainas.
<u>Rendimiento de semilla</u>	A la cosecha en g/35 plantas por entrada
<u>Longitud de la semilla</u>	En mm a la cosecha. Promedio de 30 semillas
<u>Ancho de la semilla</u>	En mm a la cosecha. Promedio de 30 semillas
<u>Relación largo/ancho de la semilla</u>	
<u>Peso de 100 semillas a 14% de humedad</u>	En g a la cosecha.

**Anexo 3.** Distancias calculadas por el método Gower (1967) del paquete estadístico SAS para 31 accesiones de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
1	****																																			
2	0.319	****																																		
3	0.122	0.306	****																																	
4	0.377	0.344	0.381	****																																
5	0.343	0.362	0.339	0.251	****																															
6	0.138	0.329	0.074	0.345	0.360	****																														
7	0.442	0.410	0.415	0.466	0.475	0.413	****																													
8	0.432	0.426	0.409	0.451	0.463	0.410	0.090	****																												
9	0.455	0.459	0.407	0.460	0.472	0.423	0.144	0.137	****																											
10	0.407	0.420	0.392	0.468	0.463	0.410	0.098	0.089	0.141	****																										
11	0.471	0.480	0.419	0.474	0.488	0.433	0.161	0.147	0.051	0.148	****																									
12	0.459	0.463	0.403	0.463	0.477	0.421	0.142	0.135	0.045	0.129	0.048	****																								
13	0.283	0.172	0.260	0.369	0.380	0.285	0.402	0.423	0.457	0.405	0.465	0.444	****																							
14	0.152	0.241	0.194	0.364	0.343	0.228	0.400	0.414	0.434	0.394	0.448	0.436	0.217	****																						
15	0.173	0.235	0.210	0.361	0.343	0.248	0.381	0.398	0.419	0.371	0.428	0.414	0.197	0.034	****																					
16	0.287	0.373	0.321	0.384	0.457	0.303	0.380	0.357	0.401	0.355	0.412	0.403	0.410	0.340	0.361	****																				
17	0.252	0.272	0.238	0.337	0.332	0.300	0.427	0.431	0.429	0.418	0.442	0.427	0.258	0.169	0.152	0.438	****																			
18	0.346	0.295	0.323	0.373	0.339	0.358	0.340	0.331	0.378	0.347	0.394	0.383	0.340	0.280	0.276	0.287	0.238	****																		
19	0.262	0.398	0.287	0.395	0.434	0.282	0.383	0.359	0.379	0.343	0.384	0.376	0.406	0.311	0.329	0.120	0.417	0.322	****																	
20	0.276	0.344	0.274	0.380	0.427	0.288	0.394	0.387	0.393	0.356	0.400	0.389	0.381	0.305	0.328	0.116	0.388	0.282	0.114	****																
21	0.230	0.206	0.227	0.367	0.365	0.235	0.356	0.376	0.397	0.378	0.411	0.396	0.171	0.102	0.081	0.346	0.172	0.227	0.355	0.339	****															
22	0.330	0.302	0.362	0.088	0.242	0.383	0.467	0.464	0.485	0.441	0.492	0.480	0.321	0.305	0.297	0.391	0.311	0.369	0.417	0.375	0.334	****														
23	0.172	0.222	0.209	0.342	0.327	0.245	0.399	0.411	0.432	0.388	0.444	0.433	0.191	0.041	0.029	0.358	0.153	0.273	0.327	0.322	0.085	0.281	****													
24	0.336	0.361	0.327	0.274	0.065	0.369	0.468	0.471	0.467	0.451	0.481	0.467	0.377	0.337	0.340	0.457	0.318	0.350	0.435	0.422	0.357	0.242	0.322	****												
25	0.324	0.351	0.291	0.229	0.060	0.341	0.470	0.459	0.450	0.458	0.468	0.457	0.368	0.328	0.329	0.452	0.302	0.336	0.401	0.406	0.350	0.227	0.313	0.071	****											
26	0.289	0.247	0.297	0.330	0.304	0.306	0.444	0.439	0.448	0.471	0.471	0.462	0.322	0.246	0.242	0.357	0.208	0.213	0.380	0.371	0.254	0.353	0.232	0.348	0.316	****										
27	0.330	0.346	0.322	0.227	0.060	0.316	0.439	0.424	0.430	0.454	0.443	0.436	0.362	0.334	0.334	0.414	0.320	0.311	0.409	0.412	0.327	0.247	0.319	0.097	0.069	0.260	****									
28	0.406	0.418	0.388	0.464	0.456	0.410	0.088	0.083	0.137	0.035	0.147	0.129	0.405	0.392	0.369	0.356	0.411	0.341	0.345	0.356	0.379	0.439	0.388	0.450	0.450	0.462	0.447	****								
29	0.354	0.378	0.348	0.230	0.049	0.340	0.460	0.450	0.453	0.476	0.471	0.462	0.381	0.356	0.360	0.433	0.346	0.339	0.431	0.434	0.353	0.255	0.343	0.085	0.083	0.283	0.054	0.469	****							
30	0.349	0.371	0.346	0.252	0.048	0.352	0.465	0.469	0.481	0.448	0.494	0.479	0.389	0.345	0.345	0.437	0.349	0.367	0.413	0.419	0.362	0.245	0.329	0.057	0.086	0.335	0.088	0.447	0.075	****						
31	0.301	0.379	0.313	0.375	0.420	0.311	0.330	0.324	0.343	0.317	0.349	0.336	0.373	0.314	0.330	0.103	0.425	0.284	0.155	0.150	0.313	0.374	0.325	0.425	0.414	0.350	0.379	0.319	0.399	0.400	****					

1= TC063; 2=TC118; 3=TC210; 4=TC238; 5=TC239; 6=TC352; 7=TC353; 8=TC354; 9=TC355; 10=TC359; 11=TC361; 12=TC362; 13= TC525; 14=TC526; 15= TC530; 16=TC531; 17=TC533A  
 18=TC533B; 19=TC534; 20=TC535; 21=TC536; 22=TC538; 23=TC550; 24=TC551; 25=TC552; 26=TC553A; 27=TC553B; 28=TC554C; 29=TC554N; 30=TC555; 31=TC556

**Anexo 4.** Entradas del agrupamiento 1 y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Forma lóbulo	Tipo lóbulo	Color pulpa	Forma semilla	Velocidad tallo	Color sépalos	Color tallo	Hábito	curvatura	Color vaina
TC063 BOLIVIA	A	0	0	4	3	9	2	1	9	1	1
TC210 BOLIVIA	A	0	0	4	3	9	2	1	9	1	1
TC352 PERU	A	0	0	4	3	9	4	1	9	1	1
TC118 HAITI	B	3	1	4	1	5	2	1	3	3	1
TC525 BRASIL	B	1	3	4	5	5	2	1	5	1	1
TC526 BRASIL	C	0	0	4	3	9	2	1	7	1	1
TC530 BRASIL	C	0	0	4	3	5	2	1	7	1	1
TC550 ECUADOR	C	0	0	4	3	5	2	1	7	1	1
TC536 BRASIL	C	0	0	4	5	5	2	1	7	3	1
TC533A BOLIVIA	D	0	0	4	3	5	2	1	5	3	1
TC533B BOLIVIA	D	0	0	4	5	5	1	1	7	3	1
TC553A ECUADOR	D	0	0	4	3	5	4	1	5	3	2

**Anexo 5.** Entradas del agrupamiento 2 y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Forma lóbulo	Tipo lóbulo	Color pulpa	Forma semilla	Velocidad tallo	Color sépalos	Color tallo	Hábito	curvatura	Color vaina
TC353 PERÚ	A	7	3	3	1	3	3	3	9	1	1
TC354 PERÚ	A	7	3	3	1	3	3	3	9	1	1
TC359 PERÚ	A	7	3	3	1	3	3	3	9	1	1
TC554C PERÚ	A	7	3	3	1	3	3	3	9	1	1
TC 355 PERÚ	B	7	3	5	1	3	3	3	9	1	1
TC361 PERÚ	B	7	3	5	1	3	3	3	9	1	1
TC362 PERÚ	B	7	3	5	1	3	3	3	9	1	1

**Anexo 6.** Entradas del agrupamiento 3 y 4; y el registro de sus estados para los caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Forma lóbulo	Tipo lóbulo	Color pulpa	Forma semilla	Velocidad tallo	Color sépalos	Color tallo	Hábito	curvatura	Color vaina
<u>GRUPO 3</u>											
TC238 ECUADOR	A	3	1	4	3	3	4	2	5	5	2
TC538 PERÚ	A	3	1	4	3	5	2	2	5	7	2
TC239 ECUADOR	B	5	7	4	3	5	4	1	3	7	2
TC551 ECUADOR	B	5	7	4	3	5	2	1	3	5	2
TC552 ECUADOR	B	5	7	4	3	5	2	1	3	5	2
TC553B ECUADOR	B	5	7	4	3	5	4	1	3	3	2
TC554N ECUADOR	B	5	7	4	3	5	4	1	3	5	2
TC555 ECUADOR	B	5	7	4	3	5	4	1	3	7	2
<u>GRUPO 4</u>											
TC531 BRASIL	A	0	0	3	5	9	3	1	9	1	1
TC556 ECUADOR	A	0	0	1	5	9	3	1	9	1	1
TC534 PERÚ	B	0	0	3	5	9	3	1	9	1	1
TC535 BRASIL	B	0	0	1	5	9	3	1	9	1	1

**Anexo 7.** Entradas del agrupamiento 1 y su promedio para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Días floración	Ancho foliolo	L/A foliolo	Días madurez	Ancho valva
TC063 BOLIVIA	A	86	10,8	1,0	212	2,0
TC210 BOLIVIA	A	86	12,0	0,9	211	2,0
TC352 PERU	A	93	11,9	0,9	222	2,0
TC118 HAITI	B	94	12,1	0,8	214	1,7
TC525 BRASIL	B	92	10,9	0,8	216	1,8
TC526 BRASIL	C	84	13,8	0,9	208	2,0
TC530 BRASIL	C	87	12,9	0,9	206	2,0
TC550 ECUADOR	C	87	13,3	0,8	208	2,0
TC536 BRASIL	C	89	11,9	0,9	207	1,9
TC533A BOLIVIA	D	80	9,4	0,9	200	1,8
TC533B BOLIVIA	D	77	10,1	0,9	193	1,8
TC553A ECUADOR	D	73	10,4	0,8	186	1,8

**Anexo 8.** Entradas del agrupamiento 2 y su promedio para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Días floración	Ancho foliolo	L/A foliolo	Días madurez	Ancho vaina
TC353 PERÚ	A	187	7,0	1,8	282	2,0
TC354 PERÚ	A	177	6,1	1,8	286	2,0
TC359 PERÚ	A	181	6,9	1,7	291	2,1
TC554C PERÚ	A	174	6,8	1,8	277	2,1
TC 355 PERÚ	B	180	5,9	1,9	290	2,1
TC361 PERÚ	B	184	6,5	1,8	291	2,1
TC362 PERÚ	B	179	6,9	1,9	292	2,1

**Anexo 9.** Entradas del agrupamiento 3 y 4; y sus promedios para los caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre los grupos. CATIE, 1998

ENTRADA	SUBGRUPO	Días floración	Ancho foliolo	L/A foliolo	Días madurez	Ancho valva
<u>GRUPO 3</u>						
TC238 ECUADOR	A	85	13,1	0,8	197	1,8
TC538 PERÚ	A	80	13,3	0,8	202	1,8
TC239 ECUADOR	B	73	15,6	0,8	173	1,6
TC551 ECUADOR	B	69	16,6	0,8	163	1,6
TC552 ECUADOR	B	72	16,2	0,8	162	1,6
TC553B ECUADOR	B	72	15,6	0,8	174	1,6
TC554N ECUADOR	B	71	16,0	0,8	166	1,6
TC555 ECUADOR	B	67	16,8	0,8	160	1,6
<u>GRUPO 4</u>						
TC531 BRASIL	A	109	12,8	1,0	230	2,6
TC556 ECUADOR	A	110	13,4	1,0	247	2,6
TC534 PERÚ	B	123	12,9	1,0	244	2,7
TC535 BRASIL	B	119	14,2	1,0	236	2,6

## **Anexo 10.**

### **Método CTAB-minipreparaciones. CATIE, 1998**

1. Pesar y macerar 0,3 g de hojas jóvenes congeladas bien limpias en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo se coloca en un eppendorf de 1,5 ml y se agrega 100 µl de buffer 2X CTAB (Anexo 11). A continuación se macera fuertemente con un pistilo.
2. Añadir 900 µl de buffer y luego 2 µl de mercaptoetanol al 0,2% (en la cámara de gases). Cerrar la tapa y agitar suavemente con el vortex hasta uniformizar la mezcla para luego incubar en Baño María a 65°C por 30 minutos.
4. El tubo se deja a temperatura ambiente por 10 minutos y se adiciona 400 µl de una solución 24:1 de cloroformo-isoamyl alcohol (cámara de gases). Mezclar suavemente con el vortex para formar momentáneamente una sola fase y microcentrifugar a 13 000 rpm por 5'.
5. Transferencia del sobrenadante a un tubo limpio y repetición del paso anterior.
6. El siguiente paso es transferir el sobrenadante a un tubo limpio con ayuda de una pipeta Pasteur. Llenar el tubo con isopropanol (-20°C) y mezclar ligeramente para precipitar el ADN. A continuación se deja reposar por 120 minutos en el congelador (-20°C).
7. Después se procede a centrifugar a 13 000 rpm por 5 minutos y luego se elimina el alcohol.
8. Adicionar 1 ml de buffer de lavado (76% de etanol y 10 mM de acetato de amonio) y se deja reposar por 20 minutos a temperatura ambiente.
9. Por último, se elimina el buffer de lavado invirtiendo el tubo y se deja secar al aire para eliminar totalmente el alcohol y luego se agrega 100 µl de TE 0,5 M, pH 7,4 para disolver el pellet de ADN y se resuspende 24 horas (Anexo 12).

### Anexo 11.

#### Buffer de extracción 2X CTAB. CATIE, 1998

La composición del buffer de extracción es la siguiente:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
Tris-HCl pH 8	100 mM
Etilendiaminotetracetato (EDTA), disodium	20 mM
NaCl	1,4 M
CTAB	2% (P/V)
Polivinilpirrolidona (PVP)	1%

### Anexo 12.

#### Buffer TE. CATIE, 1998

Esta compuesto de los siguientes reactivos:

REACTIVO	CONCENTRACIÓN
EDTA 0,5 M	1mM
Tris-HCl 1 M	10mM
Agua destilada	

### Anexo 13.

#### Metodología para la cuantificación de ADN con electroforesis en gel de agarosa. CATIE, 1998

1. Preparar suficiente buffer TBE 0,5X (Anexo 14) para la cámara de electroforesis y para el gel.
2. Preparar 100 ml de una solución de agarosa al 0,8% en TBE 0,5X (200 ml para el análisis RAPD). Calentar hasta que la agarosa se disuelva (4'15" en microhonda con poder 6).
3. Cuando la solución se haya enfriado lo suficiente como para ser sostenida en la mano, vacíela en la cubeta de electroforesis.
4. Para cada muestra coloque en sendos tubos Eppendorf los siguientes ingredientes: 1  $\mu$ l ADN + 17  $\mu$ l TE + 2  $\mu$ l "loading buffer" Bpb (Anexo 15)= 20  $\mu$ l  
10  $\mu$ l de Master Mix + 5  $\mu$ l de Taq + 5  $\mu$ l del "primer" + 5  $\mu$ l de ADN (análisis RAPD).
5. Preparar un ADN que se tenga la seguridad que esta en una determinada concentración, preferiblemente 100 ng.
6. Agitar cada muestra con un vortex y colocar en los pozos del gel con ayuda de una micropipeta. Ubicar estratégicamente el marcador de pesos moleculares.
7. Llenar la cámara de electroforesis con aproximadamente 1,5 l de buffer TBE 0,5X hasta 0,3 cm por encima del gel.
8. Cerrar la cámara de electroforesis, colocar adecuadamente los cables y poner a funcionar la fuente de poder durante 60 minutos a 100 miliamperios (120 minutos a 160 miliamperios para análisis RAPD).

9. Al finalizar la electroforesis colocar el gel en una solución de bromuro de etidio durante 60 minutos. Lavar el exceso de solución transfiriendo el gel a una bandeja con agua destilada por 1 minuto.
10. Con una lámpara de luz ultravioleta observar el resultado de la electroforesis y obtener la fotografía del gel.
11. Determinar la concentración de ADN comparando la intensidad de las bandas del marcador de peso molecular con las bandas obtenidas con las muestras.

#### Anexo 14.

#### Composición del buffer TBE 0,5X (Tris Borato EDTA). CATIE, 1998

Preparar una solución 5X de TBE de acuerdo a las proporciones que se indican a continuación:

SOLUCIÓN	VOLUMEN TOTAL	
	0,5 l	1,0 l
EDTA 0,5 M pH 8	10,0 ml	20,0 ml
TRIS BASE pH 8	27,0 g	54,0 g
ACIDO BORICO	13,8 g	27,5 g
AGUA DESTILADA (aforar hasta)	0,5 l	1,5 l

Preparar 2,5 l de una solución 0,5X agregando 250 ml de TBE 5X en 2250 ml de agua destilada.

### Anexo 15.

#### Composición del bufer Bpb. CATIE, 1998

REACTIVO	VOLUMEN
Azul de bromofenol (Bpb)	100 $\mu$ l
Glicerol	500 $\mu$ l
EDTA 0,5 M pH 8	100 $\mu$ l
Agua destilada	10 ml

### Anexo 16.

#### Protocolo para el análisis RAPD. CATIE, 1998

1. Rotular los tubos para termociclador Perkin Elmer 9600 y colocar en una gradilla sobre hielo picado.
2. Adicionar a cada tubo: 10  $\mu$ l de "Master Mix" (Anexo 17) + 5  $\mu$ l de AmpliTaq Stoffel fragment (Taq polimerasa, 3 unidades/ $\mu$ l) + 5  $\mu$ l del "primer" + 5  $\mu$ l de ADN (dilución en TE a 2 ng).
3. Cerrar los tubos con sus respectivas tapas y colocar en un termociclador.
4. Esperar 4 horas que dura el programa de amplificación mencionado en materiales y métodos. Dejar enfriar aproximadamente unos 15 minutos a 4°C.
5. Una vez finalizado el proceso, las muestras son sometidas a una electroforesis.

## Anexo 17.

### Preparación de "Master Mix". CATIE, 1998

1. Descongelar, centrifugar y mezclar en un tubo Eppendorf los oligonucleótidos (10mM) en partes equitativas (320  $\mu$ l/nucleótido). Agitar suavemente.
2. En un tubo limpio y preferiblemente autoclavo adicionar los siguientes reactivos:

Oligonucleótidos (10mM)	180 $\mu$ l
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	210 $\mu$ l
Bufer de reacción Stoffel (10X)	180 $\mu$ l
Agua pH8	30 $\mu$ l

Por reacción se utiliza las siguientes concentraciones y volúmenes:

	Concentración	Volúmen
Oligonucleótidos:		3 $\mu$ l
dCTP	0,3 mM	
dATP	0,3 mM	
dTTP	0,3 mM	
dGTP	0,3 mM	
MgCl <sub>2</sub>	3,5 mM	3,5 $\mu$ l
Buffer de reacción Stoffel:		3 $\mu$ l
Tris (100 mM)	12 mM	
KCl (100 mM)	12 mM	
Agua pH8		0,5 $\mu$ l

Anexo 18.

Rendimiento de ADN de 31 entradas de *P. tuberosus* del banco de germoplasma del CATIE, 1998.

Entrada	Repetición	Cantidad ADN (ng)	Entrada	Repetición	Cantidad ADN (ng)
TC063	1	90	TC533A	1	100
TC063	2	75	TC533A	2	100
TC118	1	95	TC533B	1	70
TC118	2	80	TC533B	2	90
TC210	1	90	TC534	1	90
TC210	2	90	TC534	2	100
TC238	1	90	TC535	1	90
TC238	2	80	TC535	2	100
TC239	1	90	TC536	1	100
TC239	2	90	TC536	2	70
TC352	1	70	TC538	1	80
TC352	2	80	TC538	2	70
TC353	1	80	TC550	1	90
TC353	2	80	TC550	2	80
TC354	1	80	TC551	1	90
TC354	2	60	TC551	2	60
TC355	1	90	TC552	1	80
TC355	2	90	TC552	2	70
TC359	1	90	TC553A	1	90
TC359	2	90	TC553A	2	50
TC361	1	60	TC553B	1	100
TC361	2	80	TC553B	2	100
TC362	1	70	TC554C	1	100
TC362	2	90	TC554C	2	60
TC525	1	80	TC554N	1	50
TC525	2	70	TC554N	2	70
TC526	1	90	TC555	1	80
TC526	2	60	TC555	2	90
TC530	1	20	TC556	1	80
TC530	2	20	TC556	2	50
TC531	1	90			
TC531	2	80			

Anexo 19. Distancias calculadas por el método de Nei (1979) con el "software" PopGene para 31 accesiones de la colección de *P. tuberosus*, CATIE, 1998

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
1	****																																			
2	0.575	****																																		
3	0.031	0.632	****																																	
4	0.207	0.693	0.246	****																																
5	0.287	0.826	0.330	0.207	****																															
6	0.031	0.632	0.000	0.246	0.330	****																														
7	0.207	0.693	0.246	0.207	0.287	0.246	****																													
8	0.207	0.693	0.246	0.207	0.287	0.246	0.000	****																												
9	0.246	0.632	0.287	0.246	0.246	0.287	0.031	0.031	****																											
10	0.207	0.693	0.246	0.207	0.287	0.246	0.000	0.000	0.031	****																										
11	0.246	0.632	0.287	0.246	0.246	0.287	0.031	0.031	0.000	0.031	****																									
12	0.246	0.632	0.287	0.246	0.246	0.287	0.031	0.031	0.000	0.031	0.000	****																								
13	0.632	0.169	0.693	0.757	0.900	0.693	0.757	0.757	0.693	0.757	0.693	0.693	****																							
14	0.207	0.575	0.246	0.287	0.374	0.246	0.287	0.287	0.246	0.287	0.246	0.632	0.632	****																						
15	0.207	0.575	0.246	0.287	0.374	0.246	0.287	0.287	0.246	0.287	0.246	0.632	0.632	0.064	****																					
16	0.064	0.470	0.098	0.133	0.287	0.098	0.133	0.133	0.169	0.133	0.169	0.521	0.207	0.207	0.207	****																				
17	0.133	0.575	0.169	0.133	0.287	0.169	0.207	0.207	0.246	0.207	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.064	****																			
18	0.064	0.575	0.098	0.133	0.207	0.098	0.207	0.207	0.246	0.207	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.133	0.064	****																		
19	0.064	0.575	0.031	0.207	0.287	0.031	0.207	0.207	0.246	0.207	0.246	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.133	0.064	****																	
20	0.064	0.470	0.098	0.207	0.287	0.098	0.207	0.207	0.246	0.207	0.246	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.133	0.064	0.064	****																
21	0.207	0.470	0.169	0.207	0.287	0.169	0.207	0.207	0.246	0.207	0.246	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.133	0.133	0.133	0.133	****															
22	0.207	0.693	0.246	0.000	0.207	0.246	0.207	0.246	0.207	0.246	0.246	0.246	0.632	0.287	0.287	0.064	0.133	0.133	0.133	0.133	0.133	****														
23	0.207	0.575	0.169	0.287	0.374	0.169	0.287	0.287	0.246	0.287	0.246	0.632	0.064	0.064	0.064	0.207	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	****													
24	0.330	0.757	0.374	0.169	0.031	0.374	0.246	0.246	0.207	0.246	0.207	0.207	0.826	0.330	0.330	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	****												
25	0.287	0.826	0.330	0.207	0.000	0.330	0.287	0.287	0.246	0.287	0.246	0.246	0.900	0.374	0.374	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	0.287	****											
26	0.207	0.575	0.246	0.133	0.207	0.246	0.207	0.169	0.207	0.169	0.133	0.133	0.693	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	****											
27	0.246	0.632	0.287	0.169	0.098	0.287	0.169	0.169	0.133	0.169	0.133	0.133	0.693	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	****										
28	0.207	0.693	0.246	0.207	0.287	0.246	0.000	0.000	0.031	0.000	0.031	0.031	0.757	0.287	0.287	0.133	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	0.207	****									
29	0.330	0.757	0.374	0.169	0.031	0.374	0.246	0.246	0.207	0.246	0.207	0.207	0.826	0.330	0.330	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	****								
30	0.330	0.757	0.374	0.169	0.031	0.374	0.246	0.246	0.207	0.246	0.207	0.207	0.826	0.330	0.330	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	0.246	
31	0.098	0.471	0.133	0.169	0.031	0.374	0.246	0.246	0.133	0.169	0.133	0.133	0.470	0.169	0.169	0.031	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	0.098	

1= TC063; 2=TC118; 3=TC210; 4=TC238; 5=TC239; 6=TC352; 7=TC353; 8=TC354; 9=TC355; 10=TC359; 11=TC361; 12=TC362; 13= TC525; 14=TC526; 15= TC530; 16=TC531; 17=TC533A  
 18=TC533B; 19=TC534; 20=TC535; 21=TC536; 22=TC538; 23=TC550; 24=TC551; 25=TC552; 26=TC553A; 27=TC553B; 28=TC554C; 29=TC554N; 30=TC555; 31=TC556

**Anexo 20**  
**Costos de Procesamiento de Muestras (Método CTAB**  
**Minipreparaciones). CATIE, 1998**

**1. Extracción de ADN y determinación de su cantidad y calidad**

**1.1 Buffer de extracción CTAB**

REACTIVO	Peso Molecular	g/l	Costo en \$	Costo/Muestra/\$
Tris-Hcl	121,1	12,11	1,02	0,0012
EDTA Na <sub>2</sub>	372,2	7,44	0,063	0,0063
NaCl <sub>2</sub>	58,44	81,82	2,63	0,00263
CTAB2% p/v		20,00	8,16	0,00816
2mercaptoe- tanol		2ml	0,13	0,0013
<b>Sub Total</b>				<b>0,02</b>

**1.2 Otras Sustancias**

SUSTANCIA	Cantidad/Muestra	Costo en \$	Costo/Muestra en \$
Nitrógeno Líquido	75 ml	0,59l	0,044
Etanol	1,5 ml	3,70 l	0,00555
Acetato de Amonio 10mM	0,077 g	46,80 /kg	0,00360
Cloroformo- IsomyI, Alch.	0,800 µl	48,15l	0,1456
Bromofenol Azul	2 µl	2,18/50ml	0,00009
T.E.	117 µl		0,003
Agarosa	0,04 g	740,2/500g	0,0592
<b>Sub Total</b>			<b>0,26</b>

### 1.3 Materiales

Tipo	Cant/Muestra	Precio \$	Precio/Unidad \$	Costa/Muestra \$
Eppendorf 1.5 ml	3	203,11/5000	0,041	0,123
Eppendorf 0.650 ml	2	36/1000	0,036	0,072
Puntas 1,000µl	3	30,01/1000	0,0300	0,09
Puntas 200µl	3	24,60/1000	0,0246	0,0738
Puntas 10µl	2	23,72/1000	0,02372	0,04744
Guantes	5	4,65/100 Unidades	0,0465	0,2325
Película Fotográfica	1 Exposición	20,01/20 Exp	1,0005	0,10005
<b>Sub Total</b>				<b>0,74</b>

### 1.4 Costo/Muestra de extracción y determinación de la cantidad y calidad de ADN

Buffer de Extracción + Otras Sustancias + Materiales = 0,02+0,26+ 0,74 = 1,02

**Anexo 21.**  
**Costos de análisis RAPD's y electroforesis. CATIE, 1998**

**1. Análisis RAPD's Y Electroforesis**

**1.1 Buffer TBE 5x**

Reactivo	Peso/Mol g	g/L	Costo \$	Costo/Mues.
Tris 1M	121,1	5,44	79,1 / Kg	0,027
EDTA	372,2	0,69	95,5 / Kg	0,0041
Ácido Bórico	61,83	2,75	38,4 / Kg	0,0065
<b>Sub Total</b>				<b>0,0376</b>

\*2.5 l de bufer alcanzan para 40 muestras

**1.2 Otras Sustancias**

Sustancia	Cantidad/Muestra	Precio \$	Costo / Muestra
DNTP	0,60µl	50,00/set	0,0234
Taq-Polimerasa	3,33 Unidades	630/6000 Unidades	0,34
Primer	5 µl	150/ Kit	0,3
Agarosa	0,1 g	740,2/500 g	0,15
Bromuro de Etidio	0,0005µg	80,00/5g	0,000008
Escalera 123 pb	239/250µg	0,0053	0,005
<b>Sub-Total</b>			<b>0,82</b>

### 1.3 Materiales

Tipo	Cantidad/Muestra	Precio \$	Precio/Unidad \$	Costo/Muestra
Tubos PCR	1	110,00/1000	0,11	0,11
Tapas PCR	1	94,50/250.	0,38	0,38
Puntas 1 ml	3	30,01/1000	0,0300	0,09
Puntas 200µl	4	24,6/1000	0,0246	0,0984
Puntas de 10µl	6	23,72/1000	0,02372	0,14232
Guantes	3	4,65/100 Unidad	0,0465	0,1395
Película Fotograf	1 Exposición	20,01/20 Exp	1,0005	0,10005
<b>Sub Total</b>				<b>1,06</b>

### 1.4 Costo del Análisis RAPD's y Electroforesis

Buffer 5x+Otras sustancias+Materiales =  $0,0376+0,82+1,06 = 1,92$

Costo por reacción: **1,92**