

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA -CATIE
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN**

ESCUELA DE POSTGRADO

**“Caracterización morfológica y molecular de genotipos de
Dioscorea alata y *D. trifida* del Instituto de Investigación
Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE, Costa Rica”.**

PRESENTADO POR:

Yessenia del Carmen González Muñoz

CATIE

Turrialba, Costa Rica

2003

**CENTRO AGRONÓMICO TROPICAL DE INVESTIGACIÓN Y
ENSEÑANZA -CATIE
PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN**

ESCUELA DE POSTGRADO

**“Caracterización morfológica y molecular de genotipos de
Dioscorea alata y *D. trifida* del Instituto de Investigación
Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE”.**

Tesis sometida a la consideración de la Escuela de Posgrado de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, como requisito parcial para optar por el grado de:

Magíster Scientiae

Por:

Yessenia del Carmen González Muñoz

Turrialba, Costa Rica

2003

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

MAGÍSTER SCIENTIAE

FIRMANTES:

Carlos Astorga Domian, M.Sc.
Consejero Principal

Wilberth Phillips, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

Andreas Ebert, Ph.D
Miembro Comité Consejero

Carmen Bieberach, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Fernando Casanoves, M.Sc.
Miembro comité Consejero

Glen Galowey
Director programa de Educación y Decano de la Escuela de Posgrado

Yessenia del Carmen González Muñoz
Candidata

Contenido

Dedicatoria	i
Agradecimientos	ii
Contenido	iv
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	viii
Índice de Anexos	ix
Resumen	x
I. Introducción	1
1.1 Objetivo General	4
1.2 Objetivos Específicos	4
1.3 Hipótesis	4
II. Revisión de literatura	6
2.1 <i>Dioscórea</i> spp.	6
2.1.1 Origen	6
2.1.2 Botánica y biología	8
2.1.3 Disponibilidad de recursos genéticos	9
2.2 Caracterización morfológica	10
2.3 Marcadores moleculares	12
2.4 ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD's)	14
2.4.1 Ventajas y desventajas	17
2.5 Métodos Estadísticos Multivariados aplicados a la Biología Molecular	17
III. Materiales y Métodos	19
3.1 Localización del estudio	19
3.2 Caracterización morfológica	19
3.2.1 Material experimental	19
3.2.2 Manejo agronómico	21
3.2.3 Caracterización de cultivares	23
3.2.4 Diseño experimental	23
3.3 Caracterización molecular	24
3.3.1 Material experimental	24
3.3.2 Aislamiento del ADN	25
3.3.3 Determinación de la concentración de ADN	25
3.3.4 Selección de "primers" y amplificación de los fragmentos de ADN por la técnica de RAPD's	26
3.3.5 Amplificación de ADN (RAPD's)	26
3.4 Análisis Estadístico	27
3.4.1 Caracterización morfológica	27

3.4.2	Caracterización molecular	27
IV.	Resultados	29
4.1	Caracterización genotípica de seis cultivares del Banco de Germoplasma del IDIAP, Panamá.	29
4.1.1	Análisis de Varianza	29
4.1.2	Análisis de Correlación y caracterización de la Variabilidad por medio de Conglomerados	32
4.1.3	Análisis de componentes principales y Funciones Discriminantes Canónicas	35
4.2	Caracterización Molecular	39
4.2.1	Aislamiento y determinación de la concentración de ADN	39
4.2.2	Amplificación del ADN	39
4.2.3	Caracterización de la colección de <i>Dioscúrea alata</i> y <i>D. trifida</i>	40
4.2.4	Caracterización molecular de seis genotipos de ñame (<i>Dioscúrea alata</i>)	44
4.2.5	Comparación de datos morfológicos y moleculares	46
V.	Discusión	47
VI.	Conclusiones	57
VII.	Recomendaciones	59
VIII.	Bibliografía	60
IX.	Anexos	65

Índice de cuadros

Cuadro 1.	Nombre del genotipo, procedencia, proveedor e información adicional de la colección de ñame (<i>Dioscorea</i> spp) del banco de germoplasma IDIAP, Pma.	20
Cuadro 2.	Nombre del cultivar, variedad y procedencia de la colección de ñame (<i>Dioscorea</i> spp) del CATIE.	21
Cuadro 3.	Secuencia de nucleótidos de los primers polimórficos seleccionados para la caracterización molecular de 37 genotipos de <i>D. alata</i> y <i>D. trifida</i> .	27
Cuadro 4.	Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para características morfológicas de ñame significativas al 0,05 de probabilidad	29
Cuadro 5.	Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de características morfológicas de ñame significativas al 0,01 de probabilidad.	30
Cuadro 6.	Resultados de la prueba de medias de rangos múltiples de Duncan para once características morfológicas	32
Cuadro 7.	Matriz de distancia de seis genotipos de ñame generada a partir de cinco características morfológicas cuantitativas usando la distancia Euclídeana	33
Cuadro 8.	Porcentaje de variabilidad genética que explica los componentes principales entre genotipos de ñame	35
Cuadro 9.	Características cuantitativas que contribuyen a explicar la variabilidad genética en genotipos de ñame en los componentes principales uno y dos.	37
Cuadro 10.	Porcentaje de las variables canónicas que explican la variabilidad	38

entre genotipos de ñame

Cuadro 11.	Análisis discriminante canónico para las características morfológicas evaluadas en 6 genotipos de ñame.	38
Cuadro 12.	Primers polimórficos utilizados para la caracterización molecular de la colección de ñame del banco de germoplasma del IDIAP y el CATIE	40
Cuadro 13.	Matriz de Similaridad de seis genotipos de ñame del Banco de Germoplasma del IDIAP	44

Índice de figuras

Figura 1. preparación del terreno para el establecimiento del ensayo de ñame	22
Figura 2. Terreno arado y surcado para iniciar la siembra de ñame	22
Figura 3. Semillas de ñame secando al aire luego de ser sometidas a un baño de Benomil	23
Figura 4. siembra de semillas de ñame a una distancia de 0,5 m y 5 cm de profundidad	23
Figura 5. Representación del diseño de siembra para la caracterización morfológica de accesiones de <i>Dioscúrea alata</i> del banco de germoplasma del IDIAP.	24
Figura 6. Hojas joven de plantas de ñame de campo.	25
Figura 7. Plántulas de ñame procedentes de cultivo <i>in vitro</i>	25
Figura 8. Dendograma basado en la distancia euclídea para seis genotipos del banco de germoplasma del IDIAP utilizando caracteres morfológicos cuantitativos.	34
Figura 9. Gráfico de árbol de recorrido mínimo que explica la variabilidad entre seis cultivares del banco de germoplasma del IDIAP	36
Figura 10. Precipitación de ADN de ñame en presencia de isopropanol frío (protocolo MATAB)	40
Figura 11. Dendograma del agrupamiento de 36 genotipos de ñame de las colecciones de germoplasma del IDIAP y CATIE, según la matriz de distancia y similitud del coeficiente de Jaccard.	43
Figura 12. Dendograma de seis genotipos de ñame de la colección de germoplasma del IDIAP según el coeficiente de Jaccard	45

Indice de Anexos

Anexo 1. Descriptores morfológicos para Dioscoreas	67
Anexo 2. Análisis de suelo. Resultado de análisis de laboratorio	70
Anexo 3. Protocolo de extracción de ADN (MATAB)	71
Anexo 4. Preparación de soluciones para protocolo MATAB	72
Anexo 5. Protocolo para el análisis de RAPDs	73
Anexo 6. Preparación de gel de agarosa	74
Anexo 7. Matriz de similaridad de 37 genotipos de ñame (<i>Dioscorea</i> spp y <i>D. trifida</i>) de las colecciones de germoplasma del CATIE y el IDIAP, generada a partir de datos moleculares por el Jaccard's Coefficient	75

González Muñoz, Y.C. 2003. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP y CATIE. Tesis M.Sc. Turrialba, Costa Rica. CATIE.

Palabras claves: *Dioscorea alata*, *D. trifida*, caracterización molecular, caracterización morfológica, RAPDs,

RESUMEN

En el presente estudio se caracterizaron morfológicamente seis genotipos del banco de germoplasma del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP, mediante características cuantitativas las cuales fueron las siguientes: días hasta el brote, longitud del tallo, número de entrenudos del tallo, altura del tallo maduro, número de tallos maduros/planta, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro, diámetro del tallo, longitud de los entrenudos, número de hojas, longitud de la punta de la hoja, longitud del pecíolo de la hoja, longitud del pecíolo en relación con el limbo/hoja. El análisis morfológico permitió identificar los niveles de variabilidad entre seis genotipos que son considerados de interés económico para el sector agrícola de producción de raíces y tubérculos en Panamá. Se identificaron 11 características morfológicas cuantitativas que permiten diferenciar a los seis cultivares de ñame del IDIAP con un nivel de significancia de 0,05 y 0,01. Según esta caracterización existen tres grupos entre los 6 cultivares de *Dioscorea alata* estudiados y no uno solo como se pensaba inicialmente. Las características que mejor discriminan entre estos grupos fueron cinco: número de ramificaciones en el tallo maduro, número de entrenudos del tallo, número de entrenudos hasta la primera ramificación, longitud de la punta de la hoja y longitud del tallo. La caracterización molecular se llevó a cabo con 37 genotipos, quince del IDIAP y veintidós del CATIE. Se usaron marcadores moleculares RAPD's los cuales mostraron ser una herramienta práctica y útil para estimar las distancias genéticas presentes en 37 genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* de los bancos de germoplasma del IDIAP y el CATIE. El análisis molecular permitió determinar que los genotipos de la colección de germoplasma del IDIAP se separan claramente de los genotipos de la colección de germoplasma del CATIE. Los genotipos de la colección de germoplasma del CATIE se dividen en dos subgrupos, uno de los cuales presenta una estructura de grupo y el otro subgrupo no presenta una estructura de grupo definida.

González Muñoz, Y.C. 2003. Morphological and Molecular Characterization of *Dioscorea alata* and *D. trifida* Genotypes from the Agricultural Research Institute of Panama (IDIAP) and CATIE. M.S. Thesis Turrialba, Costa Rica.

Key Words: *Dioscorea alata*, *D. trifida*, molecular characterization, morphological characterization, RAPDs,

ABSTRACT

This study morphologically characterized six genotypes from the germplasm bank in the Agricultural Research Institute of Panama (IDIAP) by quantitative characteristics. These include: days until budding, stem length, number of internodes on the stem, height of the mature stem, number of mature stems and plants, number of internodes before the first branching, number of branches on mature stems, stem diameter, internode length, number of leaves, leaf tip length, leaf petiole length, and petiole length in relation to the limb and leaf. The morphological analysis identified the variability levels between six genotypes which are of economic interest for the Panamanian agricultural sector of roots and tubers. Eleven quantitative morphological characteristics were identified which differentiate the six IDIAP yam cultivars with a level of significance of 0.05 and 0.01. Only one group was expected; however, according to this characterization, there were three groups in the six *Dioscorea alata* cultivars studied. There were five characteristics which helped to discriminate between these groups: number of branches on mature stems, number of internodes on the stem, number of internodes before the first branching, leaf tip length, and stem length. The molecular characterization consisted of 37 genotypes, 15 from IDIAP and 22 from CATIE. The RAPDs molecular markers used were practical and useful to estimate the genetic distance present in 37 *Dioscorea alata* and *D. trifida* genotypes from the IDIAP and CATIE germplasm banks. The molecular analysis determined that the genotypes from the IDIAP germplasm collection clearly separate from those of CATIE. The genotypes from the CATIE germplasm collection divide into two subgroups, one of which has a group structure and the other does not have a defined group structure.

Dedicada a mi esposo Edgar Eliécer, por el apoyo incondicional para seguir adelante en este reto, por su comprensión, sacrificio, dedicación y amor en mi vida.

A mis padres Luciano y Silvia, por sus enseñanzas, consejos y noches de desvelo, por ese gran amor incondicional que solo los padres sienten.

A mi madre Elba Edisa, por ser el ejemplo de dedicación y esfuerzo en la vida, por demostrarme que todo se puede lograr cuando se tiene fé en si mismo.

Agradecimientos

Primero Dios por haberme permitido alcanzar esta meta mas en mi vida.

Edgar, gracias por estar a mi lado y ser el apoyo y el sostén de mi alma.

Miles de gracias a mis padres, mi madre Elba, mis hermanos Elba Janeth y Juan Alberto; mis tios Luis Alberto y Luis Augusto, por hacerme sentir cerca de casa a pesar de la distancia, con sus llamadas y palabras de aliento

A Carlos Astorga por ser mas que un profesor consejero, un verdadero amigo y colega. Gracias por tu esfuerzo, dedicación, ayuda, amistad, confianza en mi persona desde el principio; sin tu genial y carismática personalidad, no hubiera podido terminar este esfuerzo a tiempo. Muchísimas gracias Carlos

A Wilbert Phillips y Andreas Ebert, por sus tan buenos consejos, comprensión, respeto y apoyo en todo momento.

A Fernando Casanoves, gracias, miles de gracias por ser mi guía en los momentos más decisivos de este gran esfuerzo llamado tesis, por soportarme, aconsejarme y colaborar conmigo en todo momento.

Al Instituto de Investigación Agropecuario de Panamá por darme la oportunidad de superarme y apoyarme en mi esfuerzo en conjunto para beneficio de la institución.

A mi fuente de financiamiento, el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), por darme la oportunidad de estudiar.

A Carmen Bieberach por su dedicación a mi persona y mi trabajo, por confiar en mí y permitirme compartir sus valiosos conocimientos conmigo.

A mi apreciado amigo Olman Quiros por ser la persona mas dedicada en enseñarme todas las metodologías, truquitos y mañas de trabajo dentro de un laboratorio de biología molecular.

A mis dos grandes amigos Alan Meneses y Juan Ortiz, por brindarme su amistad sincera y desinteresada, por sus consejos y buenos ratos de risas desestresantes que me hicieron tanto bien durante mi estancia en el laboratorio de biología molecular del CATIE.

A todo el personal del laboratorio de biotecnología del CATIE; Maritza, Nelly, María Elena, Liz, Patrick, Karol, Katia, Alexis, Edgar, Guillermo, Antonio, y todos aquellos que me brindaron su amistad sincera y momentos únicos en la famosa “hora del café”.

A mis compañeros y amigos de Cabirria, por su colaboración desinteresada sin importar la hora y las condiciones del clima

A mis compañeros de maestría y de estudio: Paola, Pilar, Jorje, Willian, Guillermo, Alicia, Isis, Mauricio, Mario, Neidy, Carlitos, Anabella, José Luis, Alexis, Esteban, Carmencita, Janeth, Jaime, Andrés; por su amistad sincera y única que nos permitió ser una familia lejos de nuestras tierras y nuestras verdaderas familias.

A todas aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron he hicieron de mi estancia en CATIE agradable y ha hacerme sentir como en casa. Gracias personal de la Biblioteca Orton, Mainor y Luis del BCAC, Alex Solano, Javier Sandoval, Lucrecia Salas, Jorje y Carmen del Club Internacional, Eduardo Molina...Francisco “Macho” por captar cada momento inolvidable, alegre y triste con tu lente mágico...

Introducción

Los cultivos de raíces y tubérculos desempeñarán una función múltiple en la alimentación del mundo en desarrollo durante las próximas décadas. Para el 2020, más de 2 mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de estos cultivos como fuente de alimento, forraje o ingresos en efectivo. Para los hogares rurales, el valor de las raíces y tubérculos reside en su capacidad de producir más energía digerible por hectárea por día que cualquier otro producto básico, y en su capacidad de seguir produciendo en condiciones donde otros cultivos fracasan. En el período 1995 a 1997, los agricultores de los países en desarrollo cosecharon 439 millones de toneladas de los principales cultivos de raíces y tubérculos como yuca, papa, otoi, camote y ñame, con un valor anual estimado superior a US\$ 41 mil millones, es decir casi un cuarto del valor de los cereales principales (CIP, 1999)

El ñame (*Dioscorea alata*) es un cultivo de pequeños y medianos agricultores, que constituye en muchas regiones la principal fuente de ingresos, de empleo rural y de oferta de alimento a sus pobladores y también es un producto de exportación (Sánchez y Hernández-Vásquez, s.f.). En muchos lugares es un alimento muy apreciado y constituye el principal cultivo en África occidental, parte del Asia sub-oriental, La India, algunas zonas de Brasil y otros países de América tropical. La producción mundial para el año 2002 fue de 39,6 millones de toneladas al año a nivel mundial (FAO, 2002), siendo los países de mayor producción Nigeria y Costa de Marfil, África provee más del 98% del ñame mundial lo que representa 38,1 millones de toneladas producidas al año, según estadísticas de la FAO (IITA, s.f), mientras que en América tropical la producción anual del 2002 fue de 1,01 millones (FAO,2003) en donde destacan como productores Brasil, Costa Rica, Colombia y Panamá (Poot-Matu y Mijango Cortés, 2000). El principal uso del ñame ha sido como hortaliza cocida para la alimentación humana, pero también se está utilizando en la confección de hojuelas para puré y como sustituto de las papas fritas, así como para la obtención de sustancias naturales llamadas sopogeninas las cuales son la base para la fabricación de anticonceptivos y hormonas sexuales utilizadas como tratamiento médico (Montaldo, 1991).

En Panamá el ñame representa un producto de exportación y de consumo muy apreciado sobre todo en las zonas rurales del país. Es uno de los tubérculos mas sembrados en Panamá

(4,318 ha) y su rendimiento promedio varía según el área de producción de 3,090 a 4,900 kg/ha. (PRIAG, 1997). Las investigaciones en este cultivo las inició el Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá (IDIAP) a partir de 1983 en el área de Ocú, en donde actualmente se realizan trabajos sobre manejo agronómico, fertilidad, control de plagas, densidad y, últimamente, sobre mejoramiento genético y caracterización de germoplasma, determinando las características morfológicas que distinguen entre sí a los cultivares existentes. Al igual se está iniciando en las técnicas más precisas como los marcadores moleculares que permiten detectar polimorfismos entre variedades.

En los últimos 10 años se ha incrementado significativamente la producción de ñame en Panamá, registrándose los mayores índices de áreas sembradas y rendimientos en el periodo 1995-1996. En el año 1999 se exportaron 90,744 kilos netos del clon Diamante 22, tolerante a la antracnosis, por ser el genotipo que reúne las características que satisfacen las preferencias del consumidor del mercado de exportación como los Estados Unidos y el Caribe (MIDA, 2000). Los cultivares criollos de ñame que se encuentran en el país son los más apreciados, ya que son el ingrediente principal del “sancocho” plato típico panameño y además la harina de ñame que es utilizada para la elaboración de otras comidas tradicionales del país (Bieberach *et al.*, 2001).

Los cultivares existentes en Panamá se encuentran conservados en el banco de germoplasma del Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Panamá (IDIAP), y de igual forma se obtiene semilla vegetativa sana a través de saneamiento y micropropagación por medio de técnicas *in vitro*. En la finca experimental San José en el distrito de Ocú, Provincia de Herrera, se han realizado, en los últimos dos años, ensayos de caracterización morfológica utilizando los descriptores morfológicos del IPGRI para determinar las diferencias entre los cultivares nacionales, los introducidos y las mezclas que han surgido como producto de la manipulación de los productores con el fin de obtener híbridos que sean tolerantes a enfermedades y plagas. Por lo general estos cultivares son sembrados por los agricultores de escasos recursos y su semilla es llevada de un lugar a otro por simple intercambio. De allí la importancia de poder caracterizar tanto los cultivares que se siembran de manera comercial como aquellos que son utilizados en las áreas de escasos recursos.

El CATIE conserva en su banco de germoplasma *ex situ* ubicado en la Finca Cabiria, diferentes genotipos de ñame a los cuales solo se les conoce datos de cosecha, rendimiento y palatabilidad. La diferencia entre los cultivares está determinada por los datos de pasaporte de

aquellos que han sido introducidos y por datos morfológicos recabados en el momento de la recolecta. A estos genotipos no se les ha realizado caracterización morfológica ni molecular.

Conociendo la diversidad genética de los cultivares de Dioscóreas del banco del germoplasma del IDIAP (el cual conserva tanto cultivares de uso comercial como los demás cultivares) y de la colección CATIE, permitirá la obtención de información útil para la continuación de los programas de mejoramiento genético, obtención de híbridos resistentes a enfermedades y producción de semilla básica y certificada, que lleva a cabo el IDIAP.

1.2 Objetivo General.

Caracterizar fenotípica y genéticamente la variabilidad presente en genotipos de *Dioscorea alata* y de *D. trifida* del banco de germoplasma del Instituto de Investigación Agropecuario de Panamá, IDIAP y del CATIE.

1.3 Objetivos Específicos.

Determinar el nivel de variabilidad genética presente en seis genotipos de *Dioscorea alata* del banco de germoplasma del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá por medio de marcadores moleculares y descriptores morfológicos.

Comparar las diferencias genéticas presentes en los genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del IDIAP y del CATIE por medio de marcadores moleculares.

Estimar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPD's para caracterizar la base genética de los grupos de *Dioscorea alata*.

Correlacionar los datos obtenidos con los marcadores moleculares y las características morfológicas.

1.4 Hipótesis:

- ✍ Existe variabilidad genética entre los genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* del banco de germoplasma del IDIAP y del CATIE
- ✍ La técnica molecular RAPD's es efectiva para la caracterización genética del grupo *Dioscorea alata*.
- ✍ Los marcadores moleculares RAPD's y los descriptores morfológicos permiten separar individuos en grupos acordes a características similares.
- ✍ Existe relación entre los resultados de marcadores RAPD's y las características morfológicas.

II. Revisión de literatura

2.1 *Dioscorea* spp.

2.1.1. Origen

El genero *Dioscorea* posee una amplia variedad de especies de importancia económica, comestible y medicinal, estas especies se encuentran distribuidas a lo largo de las regiones lluviosas de los trópicos y regiones subtropicales (Montaldo, 1991). Según Coursey (1976) este género tuvo una amplia dispersión a fines del cretáceo pero luego ocurrió una evolución con cursos posteriores diferentes en el viejo y en el nuevo mundo y se originaron distintos desarrollos en los dos hemisferios. La separación de las formas ancestrales asiáticas y africanas ocurrió en el mioceno.

La familia Dioscoráceae comprende seis géneros, de los cuales, Dioscórea es el mayor. Cerca de 600 especies de Dioscórea han sido identificadas y de éstas, doce son comestibles (Coursey, 1976). Dentro de este género, las especies comestibles y de valor comercial son: *Dioscórea alata*, *D. rotundata*, *D. esculenta*, *D. bulbífera* y *D. cayenensis*, las cuales son cultivadas principalmente en África (Mandal, 1973). Algunas otras especies de Dioscórea como *D. floribunda* y *D. composita*, son apreciadas debido a su alto contenido de sapogeninas esteroidales; sustancias utilizadas en la fabricación de anticonceptivos orales, hormonas sexuales y cortisona; sin embargo, éstos ñames farmacéuticos continúan siendo esencialmente especies silvestres (Rodríguez, 2000).

Para Vavilov (citado por Montaldo, 1991), *D. alata* y *D. esculenta* se originaron en Burma y Assam; según León (2000), *D. alata* tiene su origen desde el este de India hasta Nueva Guinea y en ella pudo haber sido domesticado en más de un lugar, como lo sugieren las concentraciones de los cultivares en varias regiones. De Asia se expandió a la costa oriental de África desde donde vino a América con el comercio de esclavos y es actualmente la especie mas difundida desde la costa norte de Honduras hasta Brasil, en áreas de alta precipitación. Otra especie importante es *D. cayenensis*, la cual tiene su origen en África (Montaldo, 1991). Entre las especies cultivadas, *D. trifida* es la única de origen americano. Su área de origen parece ser

Guyana y se extiende su cultivo hasta el oriente de la Península de México y las Antillas (León, 2000).

Según Wilson (1977), el ñame se diferencia de las restantes raíces y tubérculos, por su amplia diversidad genética y origen a partir de diferentes centros: América tropical (*D. trifida*), África occidental (*D. rotundata*, *D. cayenensis*, *D. bulbifera*, *D. dumetorum*) y el sudeste asiático (*D. alata*, *D. esculenta*, *D. opposita*). *Dioscorea alata* es la única especie de ñame sin representación silvestre en el mundo entero. Al igual que *D. rotundata*, *D. alata* pertenece a la sección *Enanthiophillum* del género *Dioscorea*.

D. alata se dispersó antes de los 100 años A.C en Tailandia y Vietnam y, a través del sur del Mar Chino, donde se desarrolló un centro de origen secundario cerca de las islas Celebes, desde las que se extendió a Nueva Guinea y Polinesia. Continúo su dispersión hacia el oeste atravesando el subcontinente hindú hasta detenerse frente a los desiertos de Baluchistan y Punjab (Purseglove, 1972). Cuando los portugueses penetraron el Océano Indico, aprendieron el uso de *D. alata* de los marinos hindúes y malayos, quienes lo utilizaban como provisión en sus barcos cuando emprendían viajes prolongados (Rodríguez, 2000).

Dentro del género de las Dioscóreas se distinguen, como ya se mencionó, dos tipos de especies: las especies medicinales (aproximadamente 50 especies), y las especies comestibles que forman dos grupos: las especies domesticadas y las especies silvestres. De las 40 a 50 especies domesticadas solo 11 son cultivadas de las cuales seis son fuentes de alimento (Malaurie *et al.*, 1998). Por ser tan amplio el género se ha dividido en secciones en donde las más importantes son: *Enanthiophillum* (*D. alata* y *D. cayensis*), *Combilium* (*D. esculenta*), *Osophyton* (*D. bulbifera*) y *Macrogynodium* (*D. trifida*) (Montaldo, 1991).

Las especies utilizadas a nivel mundial para la alimentación de acuerdo con Montaldo (1991) son:

✂ Complejo *Dioscorea rotundata-cayenensis*: constituye la mayor parte de la producción de ñame en África: 19 millones de toneladas al año (Kay, 1987), pero es una especie poco cultivada en América tropical. De Rizoma solitario

generalmente grueso y ramificado, tallo cilíndrico y espinoso, hojas simples, enteras, opuestas o alternas.

✂ *Dioscorea alata*: originaria del Sudeste asiático, en la actualidad constituye la principal especie cultivada. Con rizomas solitarios o agrupados de 2 a 4, redondos, cilíndricos, oblongos o de forma irregular, tallos fuertes alados sin espinas con hojas acorazonadas, simples y opuestas.

✂ *Dioscorea esculenta*: cultivada en el Sudeste de Asia y África. Rizomas pequeños en forma de racimo, tallo espinoso y hojas simples, acorazonadas.

✂ *Dioscorea bulbifera*: Cultivada en el Sudeste de Asia, África y algo en las islas del Pacífico y en las Antillas. Un solo rizoma por planta, blanco y globoso; tallo sin espinas, hojas simples, enteras, grandes, alternas u opuestas.

✂ *Dioscorea trifida*: originaria y cultivada en América tropical y algo en el Sudeste de Asia. Rizomas pequeños redondos o cónicos, tallos cuadrangulares, alados y sin espinas, hojas palmadas profundamente lobuladas y alternas.

2.1.2 Biología y Botánica

Los ñames son plantas dioicas del género *Dioscorea*, pertenecen a la familia Dioscoreaceae y producen tubérculos y bulbillos (tubérculos aéreos) de importancia económica. Su tallo es en forma de bejuco que puede llevar o no espinas. Con hojas alternas u opuestas, largamente pecioladas, tallos alados o de sección transversal ovalada (Montaldo, 1991). Las flores son pequeñas en racimos o panículas de 3 sépalos y 3 estambres sin embargo, en casi todas las especies alimenticias cultivadas hay muy escasa floración. El fruto es una cápsula sésil, aplanada o circular que es verde al formarse y café al madurar, los rizomas pueden ser solitarios o en grupo (Poot- matu y Mijangos Cortés, 2000). El rizoma y las raíces principales del ñame brotan de una especie de corno que aparece muy temprano en el ciclo de la planta; se encuentra localizado en la base del tallo (Montaldo, 1991). Estos tubérculos que se forman son predominantemente cilíndricos y ricos en carbohidratos (Mandal, 1993).

El crecimiento de este cultivo es severamente restringido por las temperaturas inferiores a los 20° C y, la planta requiere temperaturas en el rango de 25° C a 30° C para exhibir un

desarrollo normal; se adapta a periodos secos y puede sobrevivir bajo condiciones de déficit hídrico mejor que muchos cultivos, sin embargo crece mejor en aquellas áreas donde llueve durante siete u ocho meses, pero una precipitación bien distribuida o la irrigación equivalente es necesaria para acumular los 1500 mm requeridos por el cultivo durante un ciclo anual (Onwueme, 1978, citado por Rodríguez, 2000).

Los mejores rendimientos se obtienen en suelos francos, orgánicos, profundos y fértiles, que estén bien drenados y bien manejados. Tolera un amplio rango de valores de pH, siendo lo óptimo entre 5 y 6 (Montaldo, 1991).

2.1.3 Disponibilidad de Recursos Genéticos

Es probable que exista germoplasma de *Dioscorea* spp., incluyendo *D. trifida* en las estaciones experimentales de los países que lo cultivan en las Antillas, pudiendo tener algunos cultivares seleccionados. En estudios que se han realizado del germoplasma cubano de este cultivo se obtuvieron 6 especies las cuales se conservan en el Centro de Mejoramiento de Semillas Agámicas del Ministerio de la Agricultura (Rodríguez, 1980).

La estación experimental del INIA, en Iquitos, Perú, tiene una pequeña colección de doce ecotipos de la región. En la isla Guadalupe, el CIRAD tiene 77 accesiones colectados a nivel mundial, incluyendo algunos híbridos. Uno de los centros en donde más se estudia la diversidad genética de este cultivo es el Instituto Internacional de Agricultura Tropical, IITA, en Ibadan, Nigeria. Desde este centro el Grupo Consultivo de Investigación Agrícola Internacional (GCIAR), se concentra la investigación global en mejoramiento genético, selección de variedades resistentes a plagas, virus y enfermedades, líneas de alto rendimiento utilizando germoplasma local y extranjero que conserva en su banco de germoplasma (CGIAR, 2002).

Respecto a la determinación de la variabilidad genética, Ramser *et al.* (1996) utilizando marcadores moleculares RAPD's determinó las diferencias genéticas de 23 accesiones de *D. bulbifera* provenientes de diferentes localidades geográficas de África, Asia y Polinesia determinando alta heterocigosidad de las accesiones de África con Asia y Polinesia. Utilizando

la misma técnica, Asemota et al (1996), identificaron la variabilidad genética del germoplasma de ñame de Jamaica el cual hasta ese momento solo había sido caracterizado morfológicamente.

En Panamá se conserva un banco de germoplasma de Dioscoreas el cual comprende 15 cultivares. Estos materiales poseen características fenotípicas distintas según algunos ensayos realizados previamente en el IDIAP. En 1999 se realizó un ensayo de caracterización de 4 cultivares de ñame mediante la utilización de isoenzimas, más específicamente mediante la determinación de las alfa esterases, mostrando patrones de bandas diferentes para todos los cultivares (Morales *et al.*, 2001).

En la sección de colecciones de campo “Cabiria” perteneciente a la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE, se conserva un total de 68 genotipos de ñame distribuidos en nueve especies provenientes de diferentes partes del mundo (CATIE, 2003).

2.2 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 numerosos estudios en genética de poblaciones y agricultura, donde la resistencia a plagas y enfermedades y el rendimiento han sido factores importantes (Falconer, 1981).

Diferentes niveles de variabilidad pueden ser estimados usando caracteres morfológicos. Su respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos pueden ser determinados; éstos tipos de caracteres son usualmente dominantes y recesivos. 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 y cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (Enríquez, 1966).

Se entiende por caracterización a la descripción de la variación que exista en una colección de germoplasma, en términos de características morfológicas y fenológicas de alta

heredabilidad, es decir características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente. La caracterización debe permitir diferenciar a las accesiones de una especie (Abadie y Berretta, s.f).

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 éstos órganos quizás los más importantes son la flor y el fruto; le siguen en importancia otros como las hojas, troncos, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enríquez, 1991).

Para la caracterización morfológica se utilizan descriptores que deben reunir las siguientes características: ser fácilmente observables, tener alta acción discriminante y baja influencia ambiental, lo que permite registrar la información en los sitios de colecta; la uniformización de los descriptores utilizados es un requisito para que la caracterización tenga un valor universal, para ello se hace uso de las listas de descriptores bien definidos y rigurosamente probados que simplifican considerablemente todas las operaciones de registro de datos, actualización, modificación, recuperación de información, intercambio, análisis y transformación de datos (Abadie y Berretta, s.f).

Además de proporcionar un mejor conocimiento del germoplasma disponible, la caracterización bien realizada presenta algunas ventajas adicionales: permite identificar duplicados, simplificando los trabajos siguientes, racionalizando los trabajos relativos a las colecciones activas y de base, evitando duplicación de actividades y haciendo un uso más eficiente de los recursos humanos y financieros. También permiten el establecimiento de colecciones núcleos que, por definición comprenden, un mínimo de redundancia de la diversidad genética reunida en una especie cultivada y en las especies silvestres relacionadas (Valls, 1989).

Dentro de los caracteres morfológicos que definen las características del género *Dioscorea* spp., están el color y diámetro del tallo tanto joven como maduro, la presencia o no de espinas en la base del tallo o en todo el tallo, presencia/ausencia de tubérculos aéreos, forma del tubérculo subterráneo así como su anchura, color de la piel, color de la pulpa, presencia/ausencia de grietas en su superficie y propiedades organolépticas del tubérculo luego de ser cocinado (IPGRI/IITA, 1997).

2.3 Marcadores Moleculares

La definición de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN) por parte de Watson y Crick en los años '50, abrió todo un mundo de nuevas posibilidades científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de plantas, animales y microorganismos, contribuyendo en gran parte a lo que se ha dado en llamar, la revolución biotecnológica (Phillips-Mora, 1998).

Cada molécula de ácido desoxirribonucleico consiste en una doble hélice formada a partir de dos hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante enlaces de hidrógeno entre los pares de bases G-C y A-T (Alberts *et al.*, 1996).

Ahora es posible conocer el contenido genético del ADN mediante el uso de marcadores moleculares los cuales se han convertido en herramientas para identificar características que están relacionadas con resistencia a enfermedades, producción, calidad, etc. Su uso frecuente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica así también como para la caracterización e identificación de genotipos (Phillips-Mora, 1998).

A mediados de la década de los 60's los marcadores utilizados en estudios de genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos, en general fenotipos de fácil identificación visual como enanismo, deficiencia clorofílica, color de pétalos o morfología foliar. Los marcadores morfológicos contribuyeron significativamente al desarrollo teórico del análisis de ligamiento y la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Sin embargo, el pequeño número de marcadores morfológicos distintos en un mismo linaje reducía la probabilidad de encontrar asociaciones significativas entre estos marcadores y caracteres de importancia económica a través del estudio de poblaciones segregantes. La revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos los cuales se definen como un grupo de múltiples formas moleculares de una misma enzima presentes en una especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificado para cada una de las enzimas (Montaldo, 1991).

Con la llegada de las técnicas modernas de biología molecular, surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. Inicialmente la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del polimorfismo de longitud de los fragmentos de ADN o técnica mejor conocida como RFLP. Luego se desarrolló el proceso de amplificación en cadena utilizando una ADN polimerasa o técnica de PCR (Reacción de cadena de la polimerasa). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la amplificación de ADN al azar (RAPD's), fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsatélites (SSR), entre otros (Becerra y Paredes, 2000).

Uno de los aspectos fundamentales de la revolución causada por la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue la posibilidad de generar grandes cantidades de ADN de segmentos específicos del genoma, los cuales pueden ser detectados fácilmente a simple vista por medio de una electroforesis utilizando para ello "primers" o secuencias cortas arbitrarias de oligonucleótidos para dirigir la reacción de amplificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores moleculares se han utilizado o se pueden utilizar en los siguientes aspectos de la mejora de plantas: estimación de la distancia genética entre poblaciones, variedades, líneas puras e híbridos; identificación y distinción de variedades e híbridos para proteger los derechos del obtentor vegetal en el registro de variedades protegidas de cada país; establecimiento de relaciones de parentesco entre líneas de variedades para realizar estudios genéticos; localización e identificación de genes cualitativos o mayores y también de genes con efectos pequeños que afectan caracteres cuantitativos (los así llamados QTLs) (Moreno, sf)

En el área de los recursos genéticos los marcadores moleculares han provisto de información relevante en áreas claves de la conservación y caracterización de germoplasma (Otero *et al.*, 1997).

Las ventajas de los marcadores moleculares es que son fenotípicamente neutros, pues no son afectados por el medio ambiente, se pueden evaluar un número indeterminado de ellos, se puede analizar toda la planta o parte de ella, pueden ser evaluados desde que la planta está en sus primeros estados de desarrollo y aparentemente no muestran epistasis (Phillips-Mora *et al.*, 1995).

De acuerdo con Otero *et al.*, (1997), la rápida identificación de la extensión de la variación genética dentro y entre poblaciones usando marcadores moleculares, es de valor para las actividades de conservación genética y para el desarrollo de poblaciones mejoradas.

La desventaja que hoy en día tiene el uso de los marcadores moleculares en estudios de germoplasma y diversidad genética es el alto costo de los reactivos y los equipos que se utilizan para llevar a cabo las reacciones, equipos que no siempre están a disposición de todos los laboratorios de los países en desarrollo.

2.4. ADN Polimórfico Amplificado al Azar (RAPD)

Esta técnica fue desarrollada independientemente por dos grupos en Estados Unidos. Williams *et al.* (1990), describieron una técnica en el contexto del análisis mendeliano, demostrando la identificación de marcadores genéticos para mapeamiento; la patentaron con el nombre de RAPD o “Random Amplified Polymorphic DNA” (ADN polimórfico amplificado al azar). Welsh & McClelland (1990) a su vez propusieron la denominación más apropiada para la técnica, llamándola AP-PCR ó “Arbitrarily Primed Polymerase Chain Reaction” ó Amplificación al azar de la reacción en cadena de la polimerasa (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La modificación de la técnica PCR que dio origen al RAPD se logró al sustituir el uso de un par de oligonucleótidos (“primers”, iniciadores o cebadores) largos, por un solo “primer” corto y con la capacidad de unirse a muchos loci diferentes. El producto de esa unión pueden ser bandas polimórficas cuando se ha producido una pérdida, inserción o cambio de un solo nucleótido en la cadena molde (Becerra y Paredes, 2000), pero si existen diferencias en una o ambas hebras donde deben insertarse los cebadores se da como resultado la no amplificación de la banda (López, 1999).

La técnica de los RAPD, como ya se ha mencionado, se basa en una modificación de la técnica de la PCR. El PCR permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas. Pequeños oligonucleótidos, con homología a las secuencias flanqueantes, son utilizados como iniciadores por la polimerización del ADN de la región de interés (Mendoza Herrera y Simpson, 1997). Los cebadores o “primers” RAPDs son

capaces de hibridar a cientos de sitios en el ADN, sin embargo no todas las hibridaciones conllevan a la amplificación de un fragmento. Para que esto ocurra es necesario que el cebador se acople a dos sitios en cadenas opuestas del ADN, cercanos dentro de 2 kb de cada una, que es el tamaño máximo de un fragmento de PCR. Cuando éstas condiciones existen se produce una amplificación exponencial y se genera un fragmento. Los fragmentos amplificados provienen generalmente de diferentes regiones del genoma por lo que se pueden examinar múltiples *loci* rápidamente. El poder de ésta técnica se pone de manifiesto cuando se utiliza para identificar variaciones en la secuencia de ADN entre individuos; esos cambios en la secuencia producen un patrón diferente de fragmentos amplificados, los cuales son separados en geles de agarosa en presencia de bromuro de etidio y visualizados con luz ultravioleta (Cornide, 2000).

RAPD's, son marcadores dominantes, o sea, que la aparición de una banda implica que existe una homología con el cebador, todos los demás alelos que no son homólogos al sitio de unión con el cebador no se amplifican. La naturaleza de los fragmentos amplificados está fuertemente influenciado por las secuencias del ADN del organismo en estudio y las del oligonucleótido (Williams *et al.* 1990), y de las condiciones de la reacción (Becerra y Paredes, 2000).

Los resultados de RAPD's obtenidos en plantas indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5-10 loci por "primer"), su tremenda potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudios de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de la variación genética en poblaciones altamente emparentadas (Becerra y Paredes, 2000).

Para llevar a cabo el análisis de RAPD's se requiere de los siguientes cinco elementos básicos (Williams *et al.*, 1990; Phillips-Mora *et al.*, 1995; López, 1999; Arguedas, 2001):

1. ADN molde: es el ADN de cadena doble proveniente del organismo que se quiere analizar. La concentración óptima de ADN sugerida por Weising *et al.* (1995), es de 10-50 ng por 50 µl de reacción.
2. "Primer" o cebador: oligonucleótido o segmento corto formado por una cadena simple de nucleótidos, usualmente 10 en el caso de RAPD's y deben tener un contenido de al menos

un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente, con la propiedad de localizarse y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Para la mayoría de las plantas los “primers” pueden generar de 2-10 productos de amplificación.

3. Desoxinucleótidos: se requieren concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y dTTP para la síntesis de la cadena.
4. Solución “tampón”: las soluciones deben contener concentraciones óptimas de iones potasio y magnesio y ser calibrada a un pH de 8,4.
5. Taq-polimerasa: es la 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”.

Durante todo el análisis RAPD's se da una serie de reacciones químicas en forma cíclica, las cuales involucran tres fases que son definidas por cambios en la temperatura (Innis *et al.*, 1990).

1. Desnaturalización del ADN que ocurre entre 93-95° C, en este momento las dos cadenas se separan y permanecen en suspensión hasta que la temperatura se reduce.
2. Unión con el “primer” a 35° C, en sitios complementarios de la cadena disociada.
3. Síntesis del segmento complementario de la cadena en una dirección específica (5' a 3') a partir de la unión del “primer” de reacción, se produce mediante la acción de la polimerasa y la presencia de desoxinucleótidos libres en la solución y otros elementos minerales como el magnesio y el potasio, esta fase se produce a 72° C.

Estas tres fases constituyen el ciclo completo de amplificación el cual se repite entre 40 y 50 veces bajo condiciones que semejan a las que ocurren en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), logrando la amplificación exponencial de varios fragmentos de ADN (Innis *et al.* 1990). Estos fragmentos sintetizados son los marcadores RAPD's y se visualizan al someter a

electroforesis en un gel de agarosa las muestras de ADN coloreadas con bromuro de etidio para ser visualizadas con la ayuda de luz ultravioleta (Williams *et al.* 1990).

2.4.1 Ventajas y desventajas de la técnica

Las principales ventajas de la técnica de RAPD's son la rapidez en la obtención de resultados, el costo reducido, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos, la cantidad reducida de ADN requerida (Becerra y Paredes, 2000), no requiere desarrollo previo de una biblioteca de sondas específicas para el organismo de interés, permite detectar el gran polimorfismo de ADN distribuido por todo el genoma de estudio (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Una de las principales limitaciones de la técnica es el bajo contenido de información genética por locus, ya que solo un alelo es detectado al ser amplificado, a excepción de los alelos codominantes resultantes de pequeñas inserciones o deleciones en el locus RAPD (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Otra limitación es la inconsistencia de los datos debido a diferentes condiciones de laboratorio lo que produce pequeñas alteraciones en los patrones de amplificación que pueden dar origen a resultados diferentes. Esta desventaja se puede reducir logrando un alto grado de estandarización de las condiciones de reacción y de amplificación, usando un control interno para asegurar la reproducibilidad de los productos de la amplificación, además del registro de las bandas nítidas y consistentes (Becerra y Paredes, 2000).

2.5 Métodos estadísticos multivariados aplicados a biología molecular.

El origen del análisis multivariado se remonta a los comienzos del siglo XX, con Pearson y Sperman, época en la cual se empezaron a introducir los conceptos de la estadística moderna. En términos generales, el análisis multivariado se refiere a todos aquellos métodos estadísticos que analizan simultáneamente medidas múltiples (más de dos variables) de cada individuo. En sentido estricto, son una extensión de los análisis univariados (análisis de distribución) y bivariados (clasificaciones cruzadas, correlación, análisis de varianza y regresiones simples) que se consideran como tal si todas las variables son aleatorias y están

interrelacionadas (Franco e Hidalgo, 2003). Los métodos estadísticos multivariados más utilizados en estudios biotecnológicos son las distancias genéticas, los coeficientes de similitud, dendogramas y conglomerados (Martínez, 1995).

Los coeficientes de similitud se recomiendan para comparar accesiones cuyas características son evaluadas en una escala nominal o de datos de doble estado (presencia o ausencia) de las características medidas. Los valores que se obtienen de los coeficientes de similitud varían entre uno (1) y cero (0), siendo el valor 1 el de máxima similitud y el valor 0 el de mínima. Entre los índices más usados se tienen 'Simple Matching Coefficient' (SMC), Jaccard (CAJ), Rogers y Tanimoto (RT), y Dice o Sorensen (SD). Las distancias genéticas representan la similitud como la proximidad de las variables o accesiones con respecto a las demás. Son en realidad medidas de diferencias donde los valores elevados indican una menor similitud (Franco - Hidalgo, 2003).

Los análisis de conglomerados proveen al investigador de “agrupaciones naturales” de un conjunto de individuos, razas o variedades. Colocan conjuntos de individuos en grupos exhaustivos y mutuamente excluyentes, de tal forma que se puedan hacer inferencias estadísticas de semejanza o diferencias en los grupos y entre los grupos provistos por el análisis. En los dendogramas visualmente se reconocen primero los grandes grupos, es decir los que se han originados a niveles bajos de similitud; luego se analizan dichos grupos separándolos en subgrupos, conjuntos y subconjuntos hasta llegar a los núcleos que representan la máxima similitud hallada en los individuos que se estudian. (Martínez, 1995).

En el análisis de componentes principales las variables originales definen un espacio euclideo en las cuales la similitud entre ellas es medida como una distancia euclidea. Los resultados de este análisis se grafican sobre ejes ortogonales que representan los componentes principales y que delimitan un espacio bi o tridimensional en donde los individuos se sitúan dentro del espacio delimitado por las componentes según los valores de sus coordenadas con respecto a estas (Cornide, 2000).

III. Materiales y Métodos

La investigación consistió en dos fases, la primera de laboratorio para el estudio de la variabilidad genética de 37 procedencias de ñame de los bancos de germoplasma del IDIAP de Panamá y del CATIE en Costa Rica; y la segunda de campo, para evaluar morfológicamente 6 procedencias promisorias del banco de germoplasma del IDIAP en Panamá.

3.1 Localización del estudio

La caracterización morfológica se realizó en el corregimiento de San José, Distrito de Ocú, Provincia de Herrera, República de Panamá, que se encuentra ubicado a 8° 6' de latitud Norte y 80° 41' de longitud Este, con una altitud de 100 msnm., la temperatura promedio anual es de 28° C, humedad relativa de 35%, y una precipitación anual de 1500 mm (IDIAP, 2002).

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en Turrialba Costa Rica.

3.2 Caracterización morfológica

3.2.1 Material experimental

Se utilizaron 34 accesiones de *Dioscorea alata*, y 3 accesiones de *Dioscorea trifida*, de las cuales 16 accesiones pertenecen a la colección del cultivo *in vitro* del Laboratorio de Agrobiotecnología del IDIAP, y 21 accesiones del banco de germoplasma del CATIE. Para la caracterización morfológica solamente se utilizaron 6 accesiones promisorias del banco de germoplasma del IDIAP (Cuadros 1 y 2).

Los demás cultivares estudiados son conservados en la sección de colecciones de campo "Cabiria", perteneciente a la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE, ubicada en Turrialba, Costa Rica, a 9° 38' de latitud Norte, 83° 38' de longitud Oeste, con una elevación de 602 msnm, con una temperatura promedio diaria de 22,5 ° C y 2645 mm de precipitación anual.

Cuadro 1. Nombre del genotipo, procedencia, proveedor e información adicional de la colección de ñame (*Dioscorea* spp.) del banco de germoplasma IDIAP, Panamá

Nombre del genotipo	Género y Especie	Procedencia	Proveedor	Información adicional
Darién	<i>D. alata</i>	Ocú, Herrera, Panamá	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Cultivar ampliamente sembrado en Panamá. Tipo baboso que se desintegra en la cocción. Susceptible a antracnosis.
Diamante 6322	D. alata	Costa Rica	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Cultivar introducido desde Costa Rica en los 90's. Destinado a la exportación. No se desintegra en la cocción. Tolerante a antracnosis.
Clon 94	<i>D. alata</i>	Costa Rica.	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Características similares al Diamante 6322. Introducido desde Costa Rica
Mano de tigre	<i>D. alata</i>	Ocú, Herrera. Panamá.	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Tubérculo de tipo baboso que se desintegra durante la cocción. Ha caído en desuso debido a la predominancia de los cultivares Darién y Diamante
Jamaica o Jamaiquino	Desconocida	Ocú, Herrera. Panamá.	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Se presume que fue introducido desde las Antillas. Es poco cultivado
Blanco o Pelú	<i>D. alata</i>	Cuba (<i>in vitro</i>)	Instituto de Biotecnología de las plantas Universidad Central de las Villas, Villa Clara, Cuba	Introducido en forma de cultivo <i>in vitro</i> en 1992, se conserva en el banco de germoplasma del IDIAP. No se cultiva en el país. Presenta tallo y pecíolos de color morado.
Coco	<i>D. alata</i>	Desconocida	Programa de Investigación y Desarrollo en Raíces y Tubérculos Tropicales	Cultivar tradicional, sembrado en el área de Ocú. Tipo baboso. Actualmente en desuso
Cabuya	<i>D. alata</i>	Desconocida	Ing. José Antonio Aguilar	
Paleta	<i>D. alata</i>	Desconocida	Ing. José Antonio Aguilar	
Criollo baboso	<i>D. alata</i>	Pueblo Nuevo, San Carlos, Chiriquí	Ing. José Antonio Aguilar	Susceptible a enfermedades. Tipo baboso
Cristal	<i>D. alata</i>	Cerro Cabuya, Alanje, Chiriquí	Ing. José Antonio Aguilar	Tolerante a enfermedades, parecido al Diamante. Introducido en 2002.
Dioscorea trifida	<i>D. trifida</i>	Desconocida		
Culebro	<i>D. alata</i>	Desconocida		
Espinoso	Desconocida	Desconocida		
Ñampí morado	<i>D. trifida</i>	Santiago de Veraguas, Panamá		
Ñampí blanco	<i>D. trifida</i>	Santiago de Veraguas, Panamá		

Cuadro 2. Nombre de genotipo, especie, variedad y procedencia, de la colección de ñame (*Dioscorea* spp.) del CATIE.

Numero de genotipo	Género y Especie	Variedad	Procedencia
6319	<i>D. alata</i>	SEA 119-16078	Mayagüez, Puerto Rico
6323	<i>D. alata</i>	SEA 191-16083	Mayagüez, Puerto Rico
6324	<i>D. alata</i>	SEA 241-16084	Mayagüez, Puerto Rico
6326	<i>D. alata</i>	SEA 15340	Mayagüez, Puerto Rico
6327	<i>D. alata</i>	SEA 15524	Mayagüez, Puerto Rico
6328	<i>D. alata</i>	SEA 15573	Mayagüez, Puerto Rico
6344	<i>D. alata</i>	SEA 184-16080	Mayagüez, Puerto Rico
6345	<i>D. alata</i>	SEA 304-16085	Mayagüez, Puerto Rico
6346	<i>D. alata</i>	SEA 15131	Mayagüez, Puerto Rico
6347	<i>D. alata</i>	SEA 15134	Mayagüez, Puerto Rico
6348	<i>D. alata</i>	SEA 15478	Mayagüez, Puerto Rico
7064	<i>D. alata</i>	Ashmore	Petit-Buorg, GLP
7066	<i>D. alata</i>	Pakutrany	Petit-Buorg, GLP
7231	<i>D. spp.</i>	Desconocida	NI
7248	<i>D. alata</i>	Desconocida	Herrera, Panamá.
7291	<i>D. alata</i>	Desconocida	Herrera, Panamá.
7305	<i>D. spp</i>	Desconocida	NI
7311	<i>D. spp</i>	Desconocida	NI
7332	<i>D. spp</i>	Desconocida	NI
7333	<i>D. spp</i>	Desconocida	NI
7363	<i>D. alata</i>	Desconocida	Veraguas, Panamá

NI = no hay información

3.2.2 Manejo Agronómico

El material de siembra de *Dioscoreas* utilizado en la evaluación morfológica, se obtuvo del banco de germoplasma del IDIAP. Los materiales utilizados en ésta fase de la investigación fueron las variedades: Paleta, Espinoso, Darién, Cabuya y Diamante 6322.

La preparación del suelo para el establecimiento del ensayo se realizó al inicio del periodo de la estación lluviosa (mes de abril), consistió en la recolección de los troncos y piedras de la parcela, luego se procedió a arar el suelo a una profundidad entre 30- 40cm, se realizaron 2 pases de rastra (Figuras 1 y 2). Posteriormente, se procedió a confeccionar los surcos para el establecimiento del ensayo a una distancia de 1,0 m entre surcos y 40 cm de altura del lomillo para proporcionar las condiciones óptimas para el desarrollo de los tubérculos (IDIAP, 1998; IDIAP, 1999).



Figura 1. Preparación del terreno para establecimiento del ensayo



Figura 2. Terreno arado y surcado para iniciar la siembra de ñame

Después de la preparación del terreno se procedió a realizar un muestreo para la toma de muestras de suelo (20-40cm de profundidad) para enviarlas al laboratorio de suelos del IDIAP para así determinar el nivel de fertilidad y a partir de los resultados determinar los requerimientos de fertilizante para el cultivo (Anexo 2 resultados del análisis de suelo).

La semilla de ñame para establecer el ensayo consistió de secciones de tubérculos de 100 g, a los cuales se les realizó una inmersión en una solución de Benomil (Benlate) a una concentración de 2gr/l por 2 horas, el día anterior a la siembra en el campo. Después de la inmersión en la solución de Benomil las semillas se secaron a la sombra en cajas plásticas hasta el momento de la siembra(Figura 3) .

La distancia de siembra utilizada fue de 0,50 m entre plantas para una densidad de siembra de 20.000 plantas por hectárea (Jiménez *et al.* 2002). La semilla se sembró a una profundidad de 5 cm (Figura 4). No se realizó aplicación de productos químicos (nematicidas, insecticidas) al momento de la siembra del ensayo

Sobre la base del análisis de suelo, a los 40 días después de la siembra se fertilizaron las parcelas con fertilizante 15-30-8 a una proporción de 13.6g por planta (272 kg/ha).

Fue necesario mantener el cultivo limpio de malezas durante los primeros meses, mediante el control manual (Rojas *et al.*, 1997).



Figura 3. Semillas de ñame secando al aire luego de ser sometidas a un baño en Benomil



Figura 4. Siembra de las semillas de ñame a una distancia de 0,5 m y 5 cm de profundidad

3.2.3 Caracterización de cultivares

Para la caracterización de los cultivares se utilizó la lista de descriptores morfológicos del Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, (IPGRI por sus siglas en inglés) para ñame (IPGRI/IITA,1997)(Anexo1). Los datos de caracterización se han estado tomando a partir del año 2001 como parte del proyecto de investigación y desarrollo en raíces y tubérculos tropicales que lleva a cabo el IDIAP en su sección de investigación agrícola. La lista del IPGRI comprende 134 descriptores, se utilizaron para el presente estudio 72 descriptores que corresponden a desarrollo vegetativo en tallos y hojas y susceptibilidad a estrés biótico, las características relacionadas a tubérculo no fueron tomadas como en los dos años anteriores (2001-2003), debido a que el tiempo implicado para la cosecha el cual correspondía al mes de febrero del próximo año, es un periodo que se encuentra fuera del periodo correspondiente a lo estipulado para el estudio. Las 72 características se dividen en 58 características cualitativas y 14 cuantitativas (Anexo1).

3.2.4 Diseño experimental

Se caracterizaron 6 accesiones de *Dioscorea alata* utilizando un modelo correspondiente a un diseño en bloques completos aleatorizados con 3 repeticiones (que corresponden a cada año de siembra 2001-2003) y 6 tratamientos (cultivares Paleta, Kabusha, Darién, Clon94, Diamante 6322 y Espinoso). Cada parcela estaba constituida por 40 plantas en donde se tomaron al azar 20 plantas para la toma de los datos, las 20 plantas restantes representaban un borde, cada unidad de observación estaba constituido por una planta. Se aclara que los años de siembra se toman como

factor de bloqueo porque no interactúan con la respuesta de desarrollo de las plantas y el medio ambiente que se presentó en cada uno de los años de siembra.

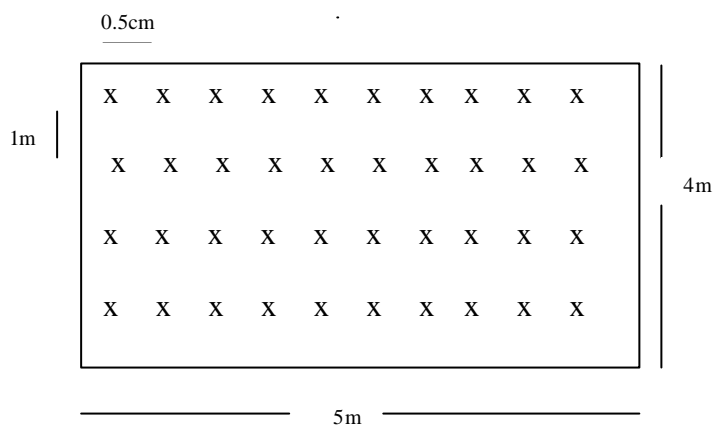


Figura 5. Representación del diseño de siembra para la caracterización morfológica de las accesiones de *Dioscorea alata* del banco de germoplasma del IDIAP.

3.3 Caracterización molecular

La caracterización molecular se realizó en el laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), ubicado en Turrialba, Costa Rica.

3.3.1 Material experimental.

El material experimental consistió en hojas jóvenes de plántulas procedentes de cultivo *in vitro* de 15 accesiones del banco de germoplasma del IDIAP (Cuadro 1). Para cada genotipo se usó el material contenido en un envase de vidrio con aproximadamente dos a tres plántulas cada uno, utilizando en su totalidad las hojas; además se usó 22 accesiones del banco de germoplasma del CATIE, que se recolectaron en la colección de campo al momento de ser utilizadas (Cuadro 2; Figuras 6 y 7).



Figura 6. Hoja joven de plantas de ñame de campo



Figura 7. Plántulas de ñame procedentes de cultivo in vitro

3.3.2 Aislamiento del ADN

Se realizaron pruebas preliminares de obtención de ADN con los protocolos de extracción Hexadecyltrimethyl-ammonium Bromide (CTAB-minipreparaciones), Potassium Ethyl Xanthogenate (PEX) y Mixed Alkyltri-methylammonium Bromide (MATAB).

Se utilizó el protocolo de extracción de ADN MATAB (Wilson et al, 1997; modificado en el Laboratorio de Biología Molecular del CATIE) (anexo 2) para los 37 genotipos de *Dioscorea* spp. basados en los resultados de las pruebas preliminares de extracción de ADN.

3.3.3 Determinación de la concentración del ADN.

La determinación de la concentración del ADN extraído se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y para cuantificar la concentración del ADN se utilizó un marcador Fago Lamda / Hind III (Promega) de “100 pb ladder”, el cual migra dentro del gel y permite comparar las bandas obtenidas de cada una de las muestras con las distintas bandas que produce el marcador. Este método de determinación de la concentración del ADN se basa en comparar el grosor y la intensidad de la banda que se produce a través de la fluorescencia producida por el complejo Bromuro de etidio-ADN y visualizada mediante el uso de luz ultravioleta (Weising *et al.*, 1995).

Después de determinar la concentración del ADN se procedió a preparar las diluciones intermedias y de trabajo de ADN a partir de las soluciones original “stock” de ADN. Del tubo original “stock” se tomó una cantidad de 100 μ l y se pasó a un tubo nuevo rotulado

como “D” o solución intermedia, agregándole 100 µl de TE, quedando la solución a un medio. A partir de la solución intermedia se realizó el cálculo para preparar la solución de trabajo a una concentración de 2ng de ADN a partir de la siguiente fórmula

$$[\text{Conc.1}] \times \text{Vol 1} = [\text{Conc.2}] \times \text{Vol 2}$$

(25 µl) (Concen. Intermedia) = # total ng / concen. a usar = vol. de TE

(25 µl) (45 ng) = total ng / 2 ng = vol. – 25 µl = vol. TE que se debe agregar.

3.3.4. Selección de “primers” y amplificación de los fragmentos de ADN por la técnica de RAPD’s

Se evaluaron un total de 20 primers de la University of British Columbia (UBC) de la serie 700-800, con la finalidad de seleccionar “primers” polimórficos. La selección de los primers polimórficos se realizó a partir de la evaluación de una muestra de 4 variedades (*D. trifida* blanco, Criollo baboso, var. 6327, var. 7305) pertenecientes a las dos especies en estudio (*D. trifida* y *D. alata*).

Del total de “primers” se seleccionaron aquellos que revelaron polimorfismos claros y consistentes, es decir que reflejaban mayor nitidez y repetitividad, siempre y cuando estas bandas polimórficas no correspondieran a los extremos del perfil.

3.3.5. Amplificación de ADN (RAPD’s)

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen total de 25 µl, el cual consistió de las siguiente ingredientes: Taq polimerasa (1.5 U/reacción), Primer (0.6 µM), cloruro de magnesio (MgCl₂) (3.5mM), STR10x buffer (1x) y ADN (10 ng)

La amplificación del ADN se hizo utilizando el termociclador de marca Perkin Elmer DNA Thermal Cycler 480 con capacidad para 48 muestras. El estudio se realizó utilizando los primers seleccionados previamente. El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa, consistió en un ciclo de desnaturalización de 5 minutos a 94° C, seguido de 40 ciclos

de 1 minuto a 94° C (desnaturalización del ADN), 1 minuto a 35° C (alineamiento del primer al ADN) y 2 minutos a 72° C (extensión de fragmento de ADN), luego un periodo de extensión de 7 minutos a 72° C. Finalmente las muestras se mantienen a una temperatura de 4° C para luego proceder a realizar la electroforesis en gel de agarosa.

3.4 Análisis estadístico

3.4.1 Caracterización morfológica

Los datos generados a partir de la caracterización morfológica se analizaron por medio del programa INFOSTAT/Profesional versión 1.6. A partir del programa se obtuvieron los resultados de las siguientes pruebas: Estadística descriptiva, Análisis de varianza univariado, Prueba de Duncan, matriz de distancia euclídea, conglomerados, Análisis de correlación de Pearson y un Análisis discriminante canónico.

3.4.2 Caracterización Molecular

Los datos generados a partir de la caracterización molecular se analizaron por medio del programa MSVP versión 3.12d (Copyright 1989-2001 Kovach Corporation Service).

El análisis consistió de lo siguiente: obtención de la matriz de distancia genética, la cual según Nei (1987) es cualquier medida de la diferencia genética, a nivel de frecuencias alélicas o secuencias de ADN, estimada entre individuos, poblaciones o especies. El índice de similitud utilizado fue el Índice de Jaccard con el cual se obtuvieron las matrices de similitud y distancia genética.

Los dendogramas fueron generados por el programa MSVP versión 3.12d (Copyright 1989-2001 Kovach Corporation Service); ellos son la representación gráfica de las relaciones entre individuos que parten del análisis de una matriz de similitud. En los dendogramas visualmente se reconocen primero los grandes grupos, es decir los que se han originados a niveles bajos de similitud; luego, se analizan dichos grupos separándolos en subgrupos,

conjuntos y subconjuntos hasta llegar a los núcleos que representan la máxima similitud hallada en los individuos que se estudian (Martínez, 1995).

Se realizó también un análisis de coordenadas principales en donde las variables originales definen un espacio euclideo, donde la similitud entre ellas es medida como una distancia euclidea. Los resultados de este análisis se grafican sobre ejes ortogonales que representan los componentes principales (gráficos biplot) y que delimitan un espacio bi ó tridimensional en donde los individuos se sitúan dentro del espacio delimitado por las componentes según los valores de sus coordenadas con respecto a estas (Franco-Hidalgo, 2003).

4. Resultados

4.1. Caracterización Morfológica de seis genotipos del banco de germoplasma del IDIAP

4.1.1. Análisis de varianzas

Se encontraron diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0,05$) o altamente significativas ($p \leq 0,01$), en 12 de las 14 variables cuantitativas estudiadas usando seis genotipos de ñame.

Tres características presentaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) (Cuadro 4). La característica con menor coeficiente de variación fue días hasta el brote ($CV=17,67$). Las otras dos características, número de ramificaciones en el tallo maduro y número de tallos maduros por planta, presentaron coeficientes de variación de 36,43 y 35,08 respectivamente.

Nueve variables presentaron diferencias altamente significativas ($p \leq 0,01$) (Cuadro 5), ellas fueron: diámetro del tallo, longitud de las espinas, longitud de la punta de la hoja, longitud del pecíolo de la hoja, longitud del pecíolo en relación con el limbo de la hoja. El máximo coeficiente de variación se presentó en la característica longitud de las espinas (38,57) y el menor se presenta en diámetro del tallo (9,47).

En el Anexo 9 se resumen las estadísticas simples (promedios, desviación estándar, varianza, coeficiente de variación, mínimos y máximos). En el presente estudio se obtuvieron características con coeficientes de variación mayores a 100% como longitud del pecíolo de la hoja (250,50), y longitud de las espinas (152,57)

Cuadro 4. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación para características morfológicas de ñame significativas al 0,05 de probabilidad.

Característica	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
-Días hasta el brote	22,06	4,80	17,67
-Número de ramificaciones en el tallo maduro	2,22	1,00	36,43
-Número de tallos maduros /planta	1,78	0,81	35,08

Cuadro 5. Promedio, desviación estándar y coeficiente de variación de características morfológicas de ñame significativas al 0,01 de probabilidad.

Característica	Promedio	Desviación estándar	Coficiente de variación
-Diámetro del tallo	4,21	1,10	9,47
-Longitud de las espinas	1,22	1,86	38,57
-Longitud de la punta de la hoja	12,56	31,45	20,70
-Longitud del pecíolo de la hoja	3,94	1,11	12,48
-Longitud del pecíolo en relación con el limbo de la hoja	3,00	0,00	19,45
-Longitud del tallo	9,60	4,12	26,52
-Número de entrenudos del tallo	5,94	2,01	14,30
-Número de entrenudos hasta la primera ramificación	1,39	0,50	16,97
-Número de hojas	5,83	2,04	19,55

Se realizó la prueba de medias de rangos múltiples de Duncan para las características que presentaron niveles de significancia menores a 0,05 en el análisis de varianza para los seis genotipos de ñame. En el Cuadro 6 se presentan los resultados de la prueba de rangos múltiples.

Días hasta el brote: el genotipo que presenta el mayor número de días para brotar es el genotipo Espinoso, pero éste no difiere significativamente de los genotipos Clon94 y Darién. Difiere significativamente de los genotipos Kabusha, Paleta y Diamante los cuales no difieren significativamente entre ellos.

Número de ramificaciones en el tallo maduro: existen diferencias significativas para el genotipo Espinoso con respecto a los genotipos Kabusha y Paleta. El genotipo Espinoso no difiere significativamente de los genotipos Diamante, Clon94 y Darién

Número de entrenudos en el tallo: el genotipo que presentó un mayor número de entrenudos en el tallo es el genotipo Diamante, sin embargo, éste no difiere significativamente de los genotipos Kabusha, Paleta, Clon94 y Darién. El menor número de entrenudos se presentó en el genotipo Espinoso pero igualmente no difiere significativamente de los genotipos Kabusha, Paleta, Clon94 y Darién. Los que difieren significativamente entre ellos son los genotipos Diamante y Espinoso.

Número de tallos maduros por planta: se observan diferencias significativas entre los genotipos Diamante y Espinoso. Los genotipos Kabusha, Paleta, Clon94 y Darién no difieren significativamente del genotipo Diamante ni del genotipo Espinoso. El que menor número de tallos maduros por planta presentó fue el genotipo Espinoso.

Diámetro del tallo: El menor diámetro de tallo se presentó en el genotipo Espinoso el cual no difiere significativamente del genotipo Diamante. Los genotipos Kabusha y Clon94 difieren significativamente de los genotipos Paleta, Darién y Espinoso pero no presentan diferencias significativas con el genotipo Diamante. Los genotipos que presentan el mayor diámetro del tallo son Paleta y Darién, que difieren significativamente de los genotipos Kabusha, Diamante, Clon94 y Espinoso.

Longitud del tallo: se presentaron diferencias significativas entre los genotipos Kabusha y Espinoso en donde la menor longitud se presenta en el genotipo Espinoso y la mayor longitud en el genotipo Kabusha. Ambos genotipos no difieren significativamente de los genotipos Paleta, Diamante, Clon94 y Darién.

Longitud de las espinas: No se presentan espinas los genotipos Kabusha, Paleta, Clon94 y Darién. Presentan espinas los genotipos Diamante y espinoso siendo las diferencias entre ellos significativas. La mayor longitud de espinas se presentó en el genotipo Espinoso.

Longitud de la punta de la hoja: la menor longitud de la punta de la hoja se presenta en el genotipo Espinoso, pero éste no difiere significativamente del genotipo Clon94. La mayor longitud de la punta de hoja se presenta en el genotipo Paleta, el cual no difiere significativamente de los genotipos Kabusha, Diamante y Darién.

Longitud del pecíolo de la hoja: El genotipo Darién presenta la mayor longitud de pecíolo, no difiere significativamente de los genotipos Kabusha y Paleta. La menor longitud de pecíolo se presenta en los genotipos Diamante, Clon94 y Espinoso los cuales no difieren significativamente entre ellos.

Longitud del pecíolo en relación al limbo de la hoja: Se presentan diferencias significativas entre el genotipo Diamante con respecto a los genotipos Kabusha, Clon94 y Darién. El genotipo Darién difiere significativamente de los genotipos Paleta, Diamante y

Espinoso. El genotipo Espinoso presenta diferencias significativas con los genotipos Darién y Kabusha.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de medias de rangos múltiples de Duncan para 11 características morfológicas.

Genotipo	Características morfológicas					
	Días hasta el brote	Número de ramificaciones en el tallo maduro	Longitud punta de la hoja	Número de entrenudos del tallo	Longitud del pecíolo de la hoja	Número de tallos maduros/planta
Kabusha	18,33 A	1,33 A	2,33 BC	6,00 AB	2,67 B	1,67 AB
Paleta	20,00 A	1,33 A	3,00 C	6,00 AB	2,67 B	2,00 AB
Diamante 6322	20,00 A	2,67 AB	2,33 BC	7,33 B	2,00 A	2,33 B
Clon94	21,67 AB	2,67 AB	2,00 AB	6,00 AB	2,00 A	2,00 AB
Darién	24,00 AB	2,00 AB	2,67 BC	5,67 AB	3,00 B	1,67 AB
Espinoso	28,33 B	3,33 B	1,33 A	4,67 A	2,00 A	1,00 A
	Diámetro del tallo	Longitud del tallo	Relación entre longitud del limbo y el pecíolo	Longitud de las espinas	Número de hojas	
Kabusha	4,03 B	12,03 B	5,00 C	0,00 A	8,00 C	
Paleta	5,67 C	9,87 AB	3,67 ABC	0,00 A	5,33 AB	
Diamante 6322	3,53 AB	8,00 AB	2,67 A	3,00 B	6,33 ABC	
Clon94	3,95 B	10,92 AB	4,33 BC	0,00 A	6,67 BC	
Darién	5,23 C	9,90 AB	5,00 C	0,00 A	4,33 A	
Espinoso	2,87 A	6,90 A	3,00 AB	4,33 C	4,33 A	

* Genotipos con la misma letra no difieren significativamente ($p \geq 0,05$)

4.2.2. Análisis de correlación y caracterización de la variabilidad por medio de conglomerados

El análisis de correlación se realizó entre catorce características cuantitativas para conocer el grado de asociación entre ellas.

De las catorce características evaluadas, solo cinco son las que más contribuyeron a explicar la variación entre genotipos, ya que las nueve restantes estaban muy relacionadas entre sí y por lo tanto aportaban poca información.

Las características no correlacionadas son: longitud de la punta de la hoja, diámetro del tallo, longitud del pecíolo de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro, longitud de las espinas

La matriz de distancia entre los seis genotipos estudiados se presenta en el Cuadro 7. La mayor distancia entre genotipos la presenta el cultivar Espinoso respecto a los otros cinco genotipos, donde se destaca el valor de 6,42 con respecto al cultivar Paleta. Los genotipos que presentan menores índices de distancia son el Darién y el Paleta con una distancia entre ellos de 2,34 seguidos por los genotipos Clon94 y Darién que se encuentran a 3,24 de distancia.

Cuadro 7. Matriz de distancia de seis genotipos generada a partir de las catorce características morfológicas cuantitativas (distancia Euclídea).

	Clon 94	Darién	Diamante	Espinoso	Kabusha	Paleta
Clon 94	0.00					
Darién	3.24	0.00				
Diamante	3.86	5.33	0.00			
Espinoso	4.83	5.68	6.07	0.00		
Kabusha	3.64	3.39	5.57	6.06	0.00	
Paleta	3.44	2.34	4.64	6.42	3.38	0.00

A partir de la matriz de distancia Euclídea se generó el dendograma utilizando el algoritmo de Ward (Figura 2). En el dendograma se observa la formación de tres grupos. El primer grupo está formado por el genotipo Espinoso que se separa del resto a una distancia de 7,0. El segundo grupo lo conforma el genotipo Diamante que se separa a una distancia de 5,8 del resto de los genotipos. El tercer grupo está conformado por los genotipos Paleta, Kabusha, Darién y Clon94. Éste tercer grupo se divide en dos subgrupos los cuales son: en el primer subgrupo están los genotipos Paleta y Darién que se separa a una distancia entre ellos de 2,4 siendo ésta la menor distancia que se observa en el dendograma. El segundo subgrupo lo forman los genotipos Kabusha y Clon94 separados a una distancia entre ellos de 3,6.

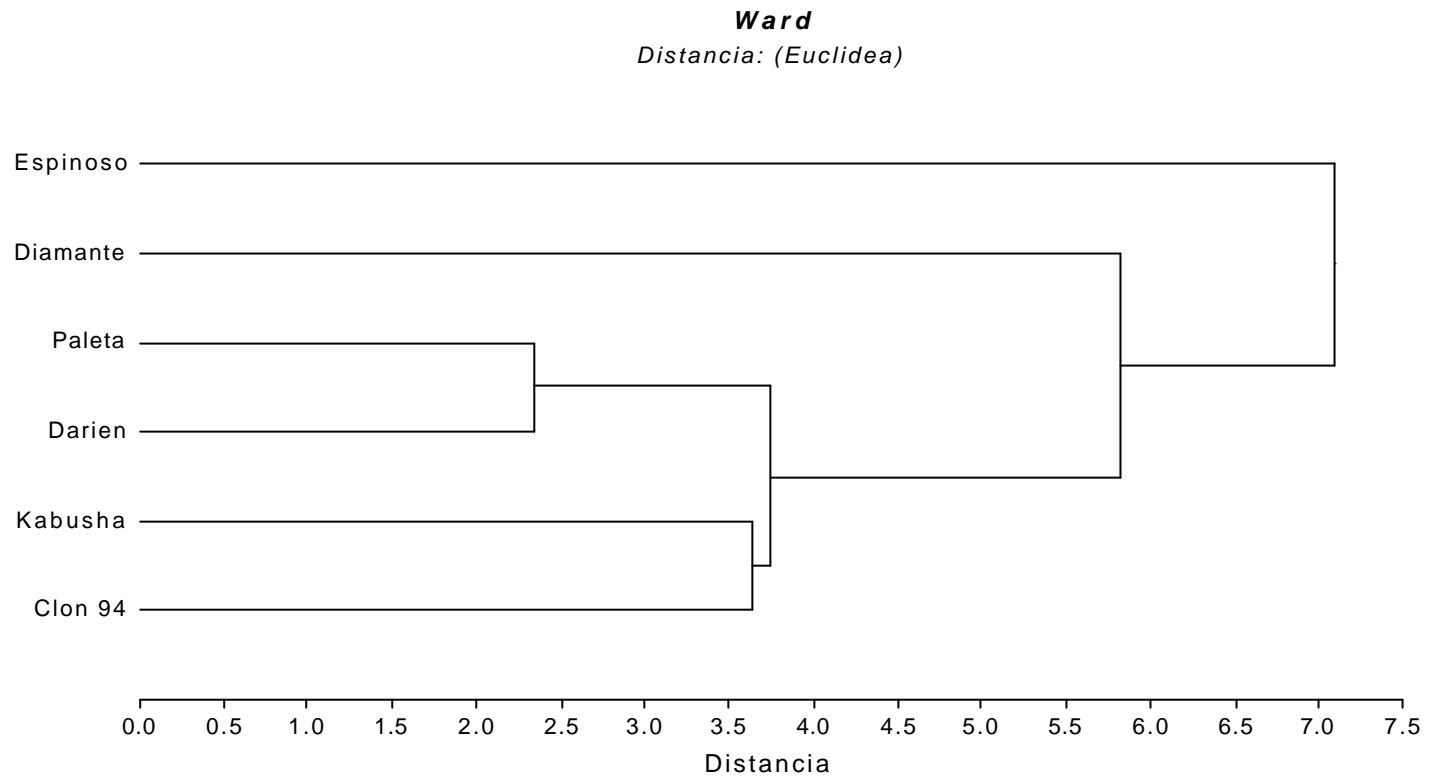


Figura 8. Dendrograma basado en la distancia Euclídea para seis genotipos del banco de germoplasma del IDIAP utilizando caracteres morfológicos cuantitativos.

4.2.3. Análisis de componentes principales y funciones discriminantes canónicas

El análisis de componentes principales muestra que gran parte de la variabilidad se explica por dos componentes principales, de los cuales el componente principal 1 explica el 47% de la variabilidad entre los genotipos y el componente principal 2 explica el 32% de la variabilidad. En total ambos componentes explican el 79% de variabilidad observada (Cuadro 8), lo que se considera aceptable como porcentaje de variabilidad.

Cuadro 8. Porcentajes de variabilidad genética que explica los componentes principales entre genotipos de ñame.

Componente	Valor ?	Porcentaje	Porcentaje Acumulado
1	5.14	0.47	0.47
2	3.50	0.32	0.79
3	1.30	0.12	0.91
4	0.75	0.07	0.99
5	0.32	0.02	1.00

A partir del gráfico de árbol de mínimo recorrido realizado sobre un biplot obtenido por análisis de coordenadas principales (Figura 9) se pueden observar ambos ejes principales, el eje 1 con un porcentaje de 55,5% y el eje 2 con un 30.7 de variabilidad explicada entre genotipos.

Se observa en el gráfico que los genotipos Diamante y Espinoso se alejan de los genotipos Clon94, Paleta, Darién y Kabusha. El componente que más contribuye a esta variabilidad es el eje uno. Los genotipos Darién y Kabusha se observan más cercanos entre ellos contribuyendo a esta cercanía el eje dos.

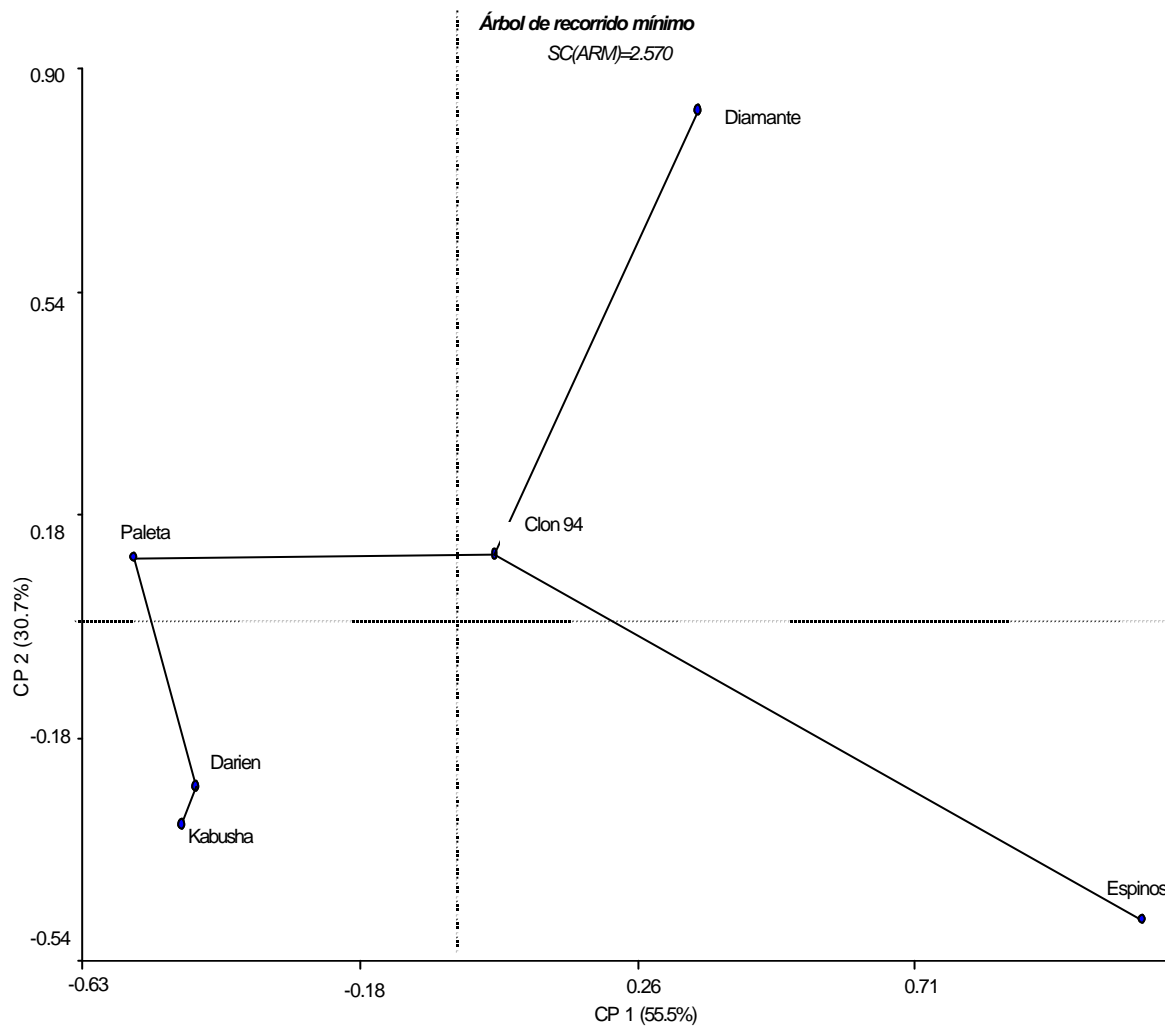


Figura 9. Gráfico de árbol de recorrido mínimo que explica la variabilidad entre seis cultivares del Banco de Germoplasma del IDIAP.

Cuadro 9. Características cuantitativas que contribuyen a explicar la variabilidad genética en genotipos de ñame en los componentes principales uno y dos.

Variables	eje 1	eje 2
Días hasta el brote	-0.35	-0.15
Longitud del tallo	0.30	-0.20
Número de entrenudos del tallo	0.24	0.42
Número de tallos maduros por planta	0.28	0.36
Número de entrenudos hasta la primera ramificación	0.02	0.49
Número de ramificaciones en el tallo maduro	-0.35	0.19
Diámetro del tallo	0.30	-0.18
Longitud de los entrenudos	-0.10	-0.24
Número de hojas	0.19	0.12
Longitud de la punta de la hoja	0.36	-0.01
Longitud del pecíolo de la hoja	0.25	-0.33
Longitud del pecíolo en relación con el limbo de la hoja	0.21	-0.36
Altura del tallo maduro	0.00	0.00
Tamaño de las alas	0.39	0.09

Las características con mayor capacidad para separar genotipos según el análisis de componentes principales son para el eje 1: tamaño de las alas, longitud de la punta de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro, días hasta el brote y longitud del tallo (Cuadro 9).

Para el eje 2 las características que contribuyen a separar los genotipos son: número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de entrenudos del tallo, número de tallos maduros por planta, longitud del pecíolo en relación con el limbo de la hoja y longitud del pecíolo de la hoja (Cuadro9).

El análisis discriminante canónico permitió determinar igualmente como en el análisis de componentes principales, las características cuantitativas más discriminantes. La variable canónica uno explica el 71,36% de la variabilidad entre los genotipos. La variable canónica dos explica el 27,27% del total de la variabilidad (Cuadro 10).

Cuadro 10. Porcentaje de las variables canónicas que explica la variabilidad entre genotipos de ñame.

Variable canónica	%	% acumulado
Variable canónica 1	71.36	71.36
Variable canónica 2	27.27	98.63
Variable canónica 3	0.79	99.42
Variable canónica 4	0.48	99.90
Variable canónica 5	0.10	100.00

Cuadro 11. Análisis discriminante canónico para las características morfológicas evaluadas en 6 genotipos de ñame.

Características	Variable Canónica1	Variable Canónica 2
- Días hasta el brote	2.38	2.70
- Longitud del tallo	11.23	6.34
- Número de entrenudos del tallo	-13.35	-5.66
- Número de tallos maduros/planta	-5.01	-2.17
- Número de entrenudos hasta la primera ramificación	25.97	7.80
- Número de ramificaciones en el tallo maduro	13.95	4.94
- Diámetro del tallo	0.36	-2.93
- Longitud de los entrenudos	-1.39	0.88
- Longitud de la punta de la hoja	2.70	-0.70
- Longitud del pecíolo de la hoja	15.47	2.59
- Longitud del pecíolo en relación limbo/hoja	1.50	-0.56

Las características que más contribuyen a explicar la variabilidad fenotípica por el análisis discriminante canónico son, para la variable canónica uno número de entrenudos hasta la primera ramificación, longitud del pecíolo de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro, número de entrenudos en el tallo y la longitud del tallo (Cuadro 11).

Para la variable canónica dos las características que contribuyen a explicar la variabilidad fenotípica son: número de entrenudos hasta la primera ramificación, longitud del tallo, número de entrenudos y número de ramificaciones en el tallo maduro (Cuadro 11).

4.2. Caracterización molecular

4.2.1. Aislamiento y determinación de la concentración de ADN

En la presente investigación se probaron los métodos de extracción de ADN: Hexadecyltrimethyl-ammonium Bromide (CTAB minipreparaciones), Potassium Ethyl Xanthogenate (PEX) y Mixed Alkyltri-methylammonium Bromide (MATAB), determinándose que el método de extracción de ADN MATAB (Anexo 3), produjo los mejores rendimientos y calidad de ADN (datos no presentados). Para la extracción de ADN se utilizó una muestra de 0.50g de hoja fresca de ñame por accesión, las cuales produjeron entre 90 y 100 ng/ μ l de ADN (Figura 10).

Se obtuvo ADN de buena calidad y pureza, sin embargo, las muestras extraídas presentaban una alta concentración de sustancias mucilaginosas que impedían la manipulación del ADN. Estas sustancias mucilaginosas fueron eliminadas adicionando 1mg de carbón activado por 200 μ l de solución de ADN precipitado durante 10 minutos para luego volver a resuspender las muestras en TE. Luego de este procedimiento se realizó la electroforesis para verificar la limpieza del material.

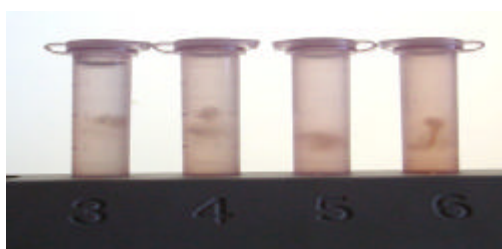


Figura 10. Precipitación de ADN de ñame en presencia de isopropanol frío (Protocolo MATAB)

4.2.2. Amplificación del ADN

Se evaluaron 28 primers UBC, de los cuales se seleccionaron los ocho que mostraron la mayor cantidad de bandas con buena resolución (UBC-701 a UBC-715, UBC-717, UBC-719, UBC-722 a UBC-728, UBC-745, UBC-760 y UBC-791). El número de bandas polimórficas por primer varió desde cinco hasta once (Cuadro 12). En total se obtuvieron 61 bandas para los 8 primers polimórficos seleccionados.

Cuadro 12. Primers polimórficos utilizados para la caracterización molecular de la colección de ñame del banco de germoplasma del IDIAP y el CATIE.

Primer	Secuencia	Nº de bandas polimórficas	Rango de amplificación en pb
UBC-701	5'-CCCACAACCC-3'	5	1031-600
UBC-703	5'-CCAACCACCC-3'	4	800-700
UBC-706	5'-GGTGGTTGGG-3'	7	1031-600
UBC-708	5'.GGGTTGTGGG-3'	8	400-100
UBC-712	5'-GGGTGTGGGT-3'	11	1031-500
UBC-714	5'-GGGTGGGTGT-3'	7	1031-500
UBC-715	5'-CCACCACCCA-3'	9	800-400
UBC-717	5'-CCCACACCCA-3'	10	800-400
Total		61	

4.2.3. Caracterización de la colección de *Dioscorea alata* y *D. trifida*

Los marcadores RAPD's generados (61 bandas polimórficas) fueron utilizados para determinar las relaciones entre los 36 genotipos de Dioscoreas. La distancia genética entre los genotipos de ñame se determinó con el paquete estadístico MVSP versión 3.12d (Copyright 1985-2001 Kovach Computing Services), para lo cual se utilizó el coeficiente de Jaccard. El

menor índice de similitud se presentó entre los genotipos de ñame Darién con *D. trifida* morado con un valor de 0,14. Mientras que el mayor índice de similitud se presentó entre los genotipos Darién y Jamaica con un valor de 0.846, determinándose que son los más semejantes (Anexo 7).

El índice de similitud para cada uno de los 37 genotipos analizados se presenta en el anexo 7, sin embargo es importante mencionar que se observa una amplia variabilidad en los valores obtenidos, indicando una amplia variabilidad genética.

El análisis de agrupamiento de los genotipos por el método UPGMA representado en el dendograma (Figura 11), muestra inicialmente la formación de dos grupos de genotipos claramente definidos donde el primero agrupa los genotipos de *D. trifida* y el segundo a los genotipos de *D. alata*, con un índice de similitud de 0,240. Dentro de los *D. trifida* se observa que el *D. trifida* Panamá y el *D. trifida* blanco se agrupan con un índice de similaridad de 0,84 y el genotipo *D. trifida* morado se presenta un tanto separado, el cual se asocia a los dos anteriores con un índice de similaridad de 0,571.

El grupo que contiene los genotipos de *D. alata* se conforma de tres subgrupos pero presenta igualmente cuatro genotipos totalmente separados, tres de ellos pertenecen a la colección del banco de germoplasma del CATIE (7311, 6327 y 6667) y el genotipo Espinoso que pertenece al de Panamá. Los índices de similaridad correspondientes a los cuatro genotipos antes mencionados corresponden a 0,253; 0,330; 0,336 y 0,294 respectivamente. Posteriormente se forma el primer conglomerado constituido por los genotipos 7333, 7332, 7291 y 7248 correspondientes a la colección de germoplasma del CATIE seguido por el genotipo 7305 que se presenta individual.

El segundo subgrupo o conglomerado está conformado mayoritariamente por 10 genotipos de la colección del IDIAP, al cual se asocia el genotipo 6324 del CATIE, indicando que este genotipo comparte características genéticas con los genotipos de la colección de germoplasma del IDIAP. En este conglomerado se observan distancias cortas entre los materiales Cristal con Clon94, se destaca la formación de un conjunto constituido por los genotipos Darién, Criollo baboso, Jamaica, Kabusha y Coco los cuales se separan en dos subconjuntos: Criollo baboso con Jamaica y Darién de forma individual, y por último Kabusha

con Coco; los materiales Blanco pelú, Mano de tigre y 6324 están a distancias más alejadas del resto de los materiales en brazos separados dentro de éste subgrupo.

El tercer subgrupo que se forma en el dendograma está constituido por genotipos de la colección de germoplasma del CATIE (13 genotipos) al cuál, se asocia el genotipo Paleta del IDIAP. Se muestran tres conjuntos en donde el primero agrupa al 7363 de forma individual y al 6323 con 6319 juntos en un subconjunto. De manera separada se encuentra el genotipo 6328 y en forma de escalera se ubican los genotipos 6345, 6348, 7064 y 7066 formando todo el segundo conjunto. Los genotipos 6326, Paleta y 7231 conforman el tercer conjunto en donde estos últimos se ubican como materiales cercanos y el 6326 separado de ellos.

Los genotipos con las distancias genéticas más cercanas son Criollo baboso con Jamaica y *D. trifida* blanco con *D. trifida* Panamá a 0.84 de distancia. Seguidos de los genotipos 6347 con 6346 y Kabusha con Coco. Los genotipos más alejados son el 7311 y el Espinoso.

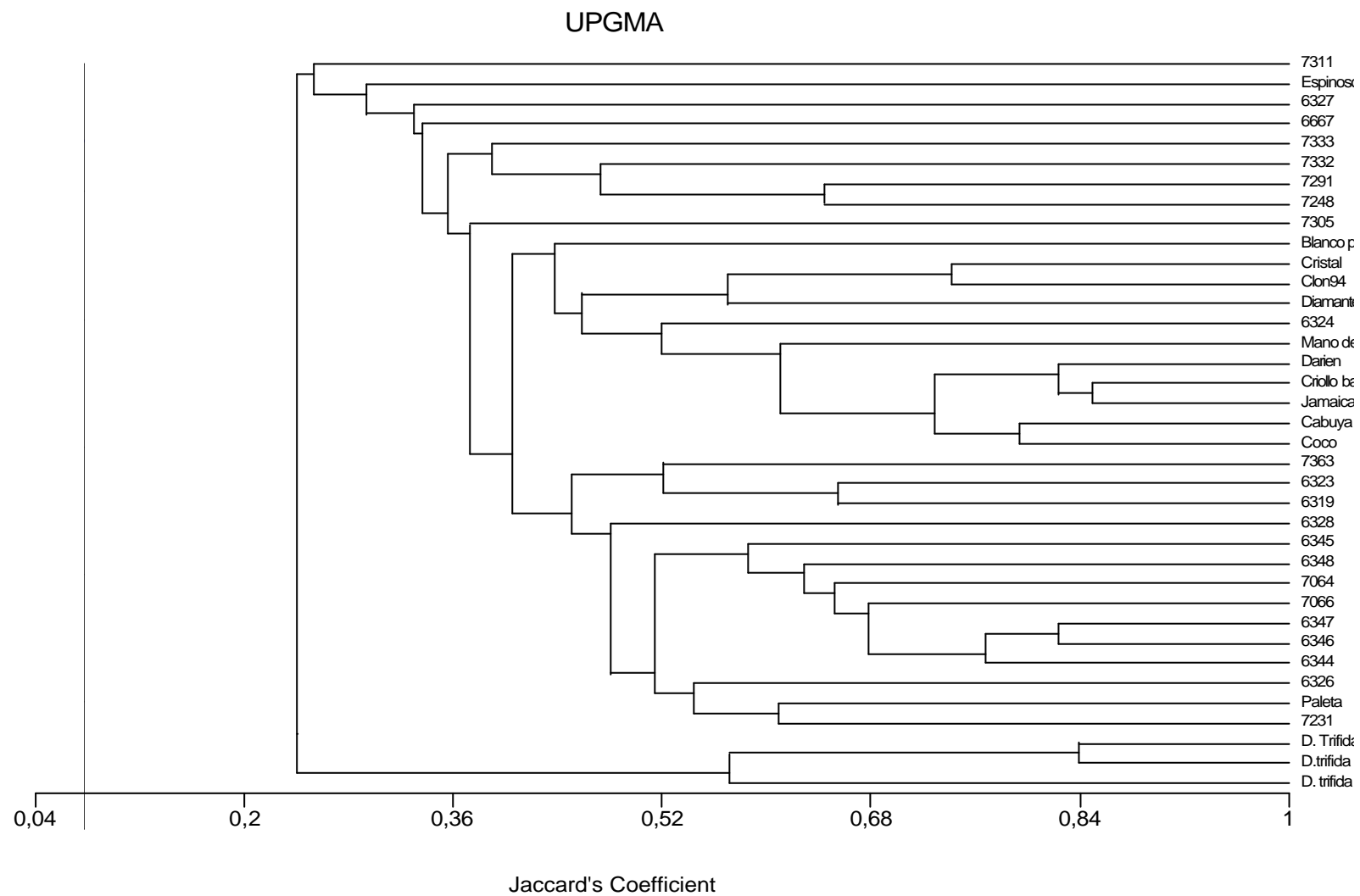


Figura 11. Dendrograma del agrupamiento de 36 genotipos de ñame de las colecciones de germoplasma del IDIAP y CATIE, según la matriz de distancia y similitud del coeficiente de Jaccard.

4.2.4. Caracterización molecular de 6 genotipos de ñame (*Dioscorea alata*) del banco de germoplasma del IDIAP.

Se realizó el análisis molecular de los genotipos Paleta, Espinoso, Diamante 6322, Clon94, Kabusha y Darién del banco de germoplasma del IDIAP, para comparar la variabilidad genética obtenida por características moleculares y características morfológicas.

En la matriz de similaridad molecular (Cuadro 13), obtenida usando el coeficiente de Jaccard se observa que los genotipos más cercanos entre sí son el Darién con Kabusha con un valor de 0.658, y los más alejados son el Kabusha con el Espinoso con un índice de similaridad de 0.286. Entre el resto de los genotipos se presentaron distancias comprendidas entre 0.615 y 0.298, indicando que son distancias promedio entre genotipos.

Cuadro 13. Matriz de similaridad de seis genotipos de ñame del Banco de Germoplasma del IDIAP

UPGMA	Coeficiente de Jaccard					
	Paleta	Espinoso	Cabuya	Darién	Dia 6322	Clon94
Paleta	1.000					
Espinoso	0.357	1.000				
Cabuya	0.595	0.286	1.000			
Darién	0.500	0.356	0.658	1.000		
Dia 6322	0.404	0.298	0.500	0.628	1.000	
Clon94	0.341	0.317	0.474	0.400	0.615	1.000

En el dendograma de los seis genotipos se forman dos grupos: el primer grupo en donde el genotipo Espinoso se separa totalmente del resto de los genotipos, a una distancia de 0.90, y un segundo grupo que se subdivide en dos subgrupos. En el primer subgrupo constituido por los genotipos Paleta, Kabusha y Darién, el genotipo Paleta se separa de Kabusha y Darién a una distancia de 0.74, y los genotipos Kabusha y Darién se unen a una distancia entre ellos de 0.50 que es la más cercana de todo el dendograma.

El segundo subgrupo está conformado por los genotipos Diamante 6322 con el Clon94 que se encuentran a una distancia de 0.57.

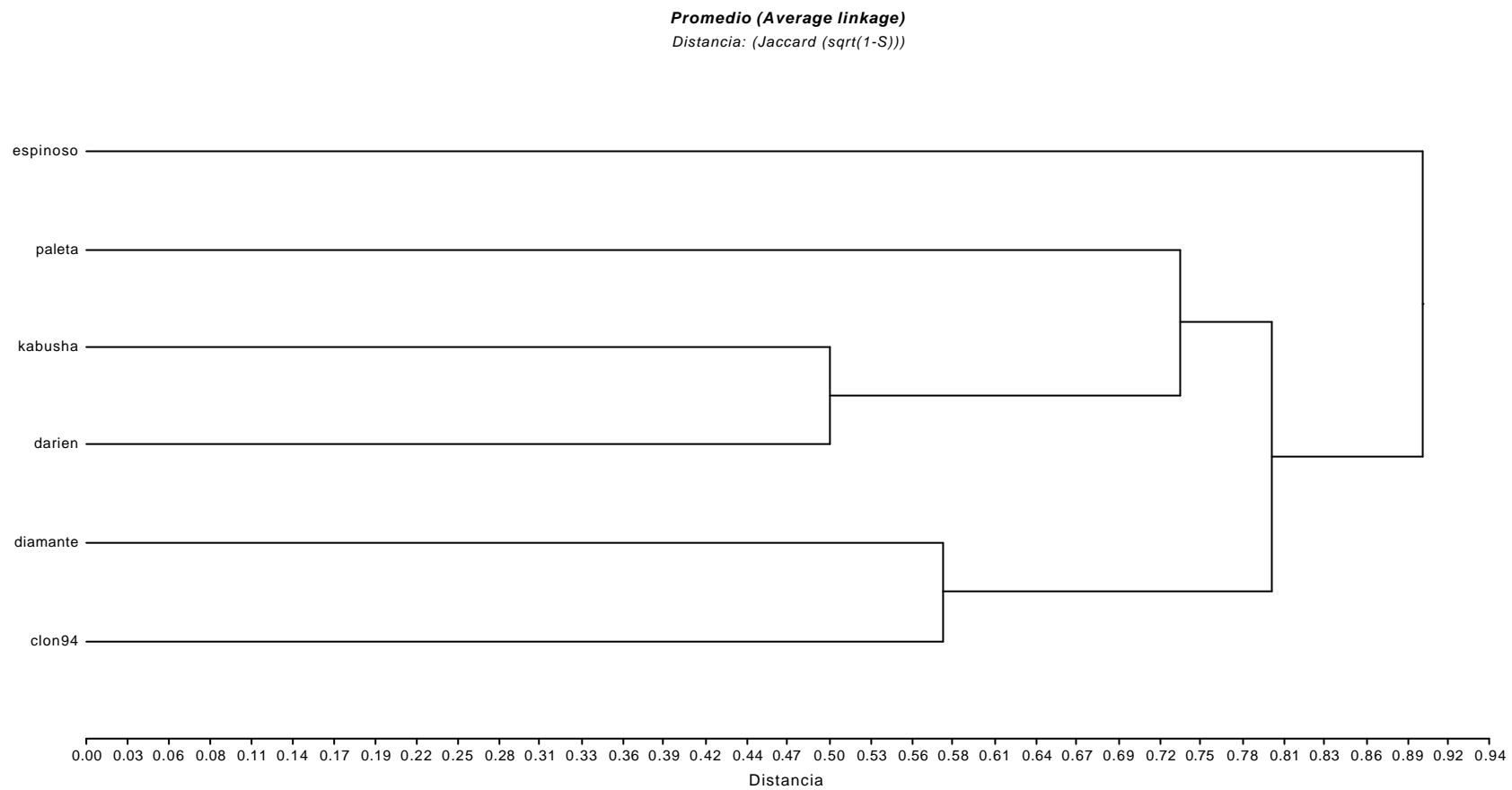


Figura 12. Dendrograma de 6 genotipos de ñame de la colección de germoplasma del IDIAP según el coeficiente de Jaccard.

4.2.5. Comparación de datos morfológicos y moleculares

El análisis de comparación de las matrices dio como resultado que no existe asociación entre las matrices de disimilaridad de los datos morfológicos y los datos moleculares.

El valor del coeficiente de Pearson es de 0,915, valor que no es significativo a $p > 0,05$ y $p > 0,01$, demostrando que no hay nivel de asociación entre ambas matrices, lo cual se puede atribuir a la naturaleza de los datos de caracterización morfológica que son influenciados por factores del ambiente, mientras los marcadores moleculares son neutros, o sea no influenciados por el ambiente.

5. Discusión

La evaluación de la variabilidad genética de la colección de Dioscorea alata y D. trifida de los bancos de germoplasma del IDIAP y CATIE permitió identificar grupos genéticos dentro de los 37 genotipos evaluados molecularmente, así como separar los seis genotipos evaluados morfológicamente.

5.1. Caracterización morfológica

El análisis morfológico permitió identificar los niveles de variabilidad entre seis genotipos que son considerados de interés económico para el sector agrícola de producción de raíces y tubérculos en Panamá. Se identificaron características cuantitativas de poder discriminar entre los genotipos, las cuales están relacionadas en mayor proporción con el tallo de las plantas. Estas características son menos influenciadas por el ambiente respecto a otras analizadas, por lo que su evaluación podrá ahorrar tiempo en futuros trabajos de caracterización de germoplasma (IPGRI/IITA, 1997).

Se identificaron 11 características morfológicas cuantitativas que permiten diferenciar a los seis cultivares de ñame del IDIAP con un nivel de significancia de 0,05 y 0,01. Según esta caracterización existen tres grupos entre los 6 cultivares de *Dioscorea alata* estudiados y no uno solo como se pensaba inicialmente. El primer grupo contiene solo al genotipo Espinoso, y un segundo grupo a los genotipos Diamante 6322. El tercer grupo contiene a los genotipos Paleta y Darién formando un subgrupo, y los genotipos Kabusha y Clon94 formando el segundo subgrupo.

Las características cuantitativas que mejor discriminan entre estos grupos fueron cinco: número de ramificaciones en el tallo maduro, número de entrenudos del tallo, número de entrenudos hasta la primera ramificación, longitud del pecíolo de la hoja y longitud del tallo. Se observa que las características de tallo y las características relacionadas con la hoja fueron importantes para determinar la distribución de la variabilidad de los genotipos. Además cabe anotar que éstas características no son muy influenciadas por el ambiente por lo tanto se facilita considerablemente la toma de datos en campo y se ahorra tiempo. Estos resultados concuerdan con los estudios realizados por

Hamon & Touré (1990) para la clasificación de cultivares de ñame pertenecientes al complejo *Dioscorea cayenensis-rotundata* del oeste de África, en donde utilizaron 24 descriptores morfológicos para clasificar los genotipos, de los cuales 7 estaban relacionados con el tallo como por ejemplo tamaño del tallo, número de ramificaciones en el tallo, longitud del entrenudo en el tallo maduro, longitud de las espinas, etc, por mencionar algunos.

Como se puede observar las características relacionadas con el desarrollo vegetativo no solamente nos permiten determinar la variabilidad entre especies de *Dioscoreas* sino que también entre genotipos de cada especie como lo realizaron Hamon & Touré (1990).

El análisis de correlación de las características morfológicas se llevó a cabo con 14 características lo cual generó 5 características no correlacionadas entre sí que permitió determinar la variabilidad entre los seis genotipos de ñame estudiados. Las características longitud de la punta de la hoja, longitud de las espinas, longitud del pecíolo de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro y diámetro del tallo, fueron las características menos correlacionadas que permitieron separar los genotipos de una manera satisfactoria ya que éstas características representan patrones naturales de variación y de desarrollo vegetativo dentro de los genotipos y no son influenciadas por el medio ambiente. Características no correlacionadas como las obtenidas en el presente estudio fueron utilizadas en el estudio realizado por Cruz *et al.* (1999), para determinar la diversidad geográfica de la colección de 326 accesiones de ñames comestibles de Filipinas, en donde se utilizaron 113 características en tres especies de ñame *Dioscorea alata*, *D. esculenta* y *D. hispida*, obteniendo que se debe tomar más en consideración este tipo de características no correlacionadas, las cuales, influyen decisivamente en la separación de los grupos tanto entre especies como dentro de especies.

Los resultados obtenidos en el estudio coinciden con lo publicado por el IPGRI/IITA (1997), en su clave de descriptores para especies *Dioscoreas* más importantes en donde las características de arquitectura de la planta como las relacionadas a tallo y hojas, son básicas y necesarias y la mayoría de las veces son

descriptores mínimos altamente discriminantes para los ñames comestibles más importantes.

El análisis de la matriz de distancia genética por medio de la distancia euclídea de seis genotipos de ñame del banco de germoplasma del IDIAP, indica que el genotipo Espinoso es el que mayor distancia genética (6,42) muestra con respecto al genotipo Paleta. Se ubica a los genotipos Paleta con Darién como los más cercanos (2,34). Éstos dos últimos genotipos comparten muchas características en común, como son la arquitectura de planta y características del tubérculo que en años anteriores ha evaluado el IDIAP (Jiménez, 2001), a través de sus investigaciones de caracterización de germoplasma. El genotipo Espinoso presenta características morfológicas como presencia de espinas, tallo redondo y ausencia de alas en el tallo que lo separan de los demás genotipos y hace que en la matriz de distancia presente un valor de índice de distancia elevado.

En el dendograma generado a partir de la distancia genética y el algoritmo de Ward, se presenta la dispersión de los genotipos en un plano cartesiano, con una distribución de los genotipos que es congruente con la obtenida en la matriz de distancia genética. Por la variabilidad de los genotipos, estos se separan en tres grupos: el primero representado por el genotipo Espinoso, el segundo grupo por el genotipo Diamante y el tercero por los genotipos Kabusha, Darién, Paleta y Clon94. Tomando en cuenta las características de alta heredabilidad en la clasificación de los genotipos de ñame como son las relacionadas a hoja y tallo y que fueron evaluadas en el presente estudio, el genotipo Espinoso se separa completamente igual como se observa en la matriz de distancia genética. Comparando tanto la matriz de distancia como el dendograma se observa que los genotipos más cercanos que se presentan en la matriz de distancia son el Paleta con el Darién a 2,4 de distancia, de igual manera como se presentan en la matriz. Tanto en la matriz de distancia como en el dendograma se observa la relación cercana entre los genotipos Paleta, Kabusha y Clon94 con el genotipo Darién. Es importante mencionar que el genotipo Darién es un genotipo nacional panameño altamente consumido, el cual ha sido muy utilizado por los agricultores para mejoramiento genético convencional y del cual han derivado diversos

híbridos nacionales que, dependiendo de la región en donde se origina los agricultores le asignan un nombre, y los intercambian con otros agricultores de otras regiones². De allí, quizás, las relaciones cercanas entre este genotipo y los genotipos Kabusha, Paleta y Clon94.

²Jimenez Domitilo y Aguilar José Antonio. Comunicación personal, IDIAP, Panamá, 2003.

En este estudio los resultados del análisis de componentes principales son interpretados tomando como base los valores observados para cada componente principal. La acumulación de los porcentajes que explican la variabilidad total observada, se obtiene de dos componentes principales en un 79%. Rojas (2003), se basa en los criterios de Cliff quien en un estudio en 1987, indica que se deben tomar como aceptables los componentes cuyos valores propios expliquen un 70% o más de la varianza total.

Las características que más contribuyen a la variabilidad de los genotipos según los resultados del análisis de componentes principales son: tamaño de alas, longitud de la punta de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro, días hasta el brote y longitud del tallo. Esto nos permite concluir que el análisis de componentes principales permite diferenciar entre aquellos genotipos que presenten diferencias en su tiempo de brotación, que presenten un tallo mas largo y presencia o ausencia de alas, como características muy representativas para separar genotipos.

En el presente estudio se toma el criterio sugerido por Cliff (citado por Rojas, 2003), para explicar la variabilidad del conjunto de características tomadas que separa en grupos a los genotipos analizados. El primer componente principal contribuye con el 47% de la variabilidad explicada y el segundo componente contribuye con el 39%.

Este análisis de componentes principales se asocia con el análisis discriminante canónico en donde se presentan las características estudiadas más discriminantes que explican la variabilidad entre los genotipos a través de los dos ejes canónicos.

En el análisis discriminante canónico cinco características son las que más contribuyen para explicar el 98,63% de la variabilidad. Para la variable canónica uno las

características son: longitud del tallo, número de entrenudos en el tallo, número de entrenudos hasta la primera ramificación, número de ramificaciones en el tallo maduro y longitud del pecíolo de la hoja. Lo anterior indica que la variable canónica uno permite distinguir a los genotipos que presentan diferencias en la longitud del tallo y el número de ramificaciones a los veinte días después de la brotación, periodo en el cual se toman los datos para éstas características.

Para la variable canónica dos, que explica el 27,27% de la variabilidad están las características número de entrenudos hasta la primera ramificación y longitud del tallo, número de entrenudos y número de ramificaciones en el tallo maduro. A pesar de ser solo cuatro características, las mismas son consideradas como parte del grupo de las características mínimas altamente discriminantes entre genotipos de ñame comestibles que presenta el IPGRI (1997) en su clave de descriptores para especies de *Dioscoreas* más importantes.

La variabilidad genética de los genotipos estudiados del banco de germoplasma del IDIAP basándose en los resultados del análisis de componentes principales y análisis discriminante canónico, expuesto en un gráfico de árbol de recorrido mínimo, nos separa al genotipo Espinoso de los otros genotipos. Igualmente, se separa el genotipo Diamante del resto y se mantienen agrupados en pares los genotipos Paleta con Darién y los genotipos Diamante con Clon94. Esta representación gráfica de los componentes principales muestra que en los genotipos estudiados existe una amplia diferencia morfológica entre el genotipo Espinoso y los demás genotipos Diamante, Paleta, Kabusha, Darién y Clon94, entre los cuales existe una relación un poco más cercana. En el caso del genotipo Espinoso hay características que contribuyen de forma positiva, como la longitud de las espinas, longitud del tallo y el número de ramificaciones en el tallo maduro, en la variabilidad de ambos ejes canónicos que lo discriminan del resto de los genotipos.

5.2. Caracterización Molecular

El análisis de la diversidad genética presente en los genotipos de ñame mediante el uso de la metodología RAPD's mostró ser una herramienta práctica y útil para estimar las distancias genéticas presentes en 37 genotipos de *Dioscorea alata* y *D. trifida* de los bancos de germoplasma del IDIAP y el CATIE.

Para el aislamiento de ADN de ñame se ensayó previamente con el protocolo CTAB-minipreparaciones, según lo sugerido por Ramser *et al.*, (1997 y 1999) para extraer ADN de *Dioscorea rotundata*-*D. cayenensis* y *D. bulbífera*, y por Mignouna *et al.*, (2002), que extrajeron ADN de *D. rotundata* y *D. alata* con éxito en sus investigaciones. Sin embargo, en el presente estudio no se logró obtener la concentración de ADN necesario para las pruebas posteriores mediante este protocolo de extracción. Por ello, se realizaron pruebas con otros protocolos de extracción de ADN como el protocolo PEX y el protocolo MATAB, resultando este último el más eficiente. Este resultado de obtención de ADN de ñame por medio del protocolo MATAB no se tiene registrado en ninguna de las referencias revisadas hasta el presente. Las concentraciones que se obtuvieron fueron entre 85 y 100 ng/µl, sin embargo, se observó la presencia de mucílago en las muestras, situación ya reportada por Morales *et al.*, (2001) cuando utilizó hojas de ñame, sugiriendo en ese momento la utilización del tubérculo para la extracción del ADN. En nuestro caso se utilizó carbón activado en las muestras para extraer el mucílago y purificar el ADN, dando resultados satisfactorios permitiendo la optimización y maximizando la eficiencia del protocolo MATAB para la extracción de ADN de ñame. Otros autores como Ramser *et al.*,(1996) y Asemota *et al.*,(1996), sugieren la utilización de cloruro de cesio (CsCl) para la purificación del ADN, procedimiento mas elaborado y peligroso por lo que no fue tomado en consideración.

El polimorfismo detectado fue satisfactorio si se compara con trabajos anteriores: de 28 primers probados, 8 presentaron loci polimórficos y en total se obtuvieron 61 bandas correspondientes al 96.8% que permitieron determinar diferencias significativas entre genotipos de *D. alata* y *D. trifida*. Ramser *et al.* (1997) logró obtener resultados exitosos al utilizar 10 primers de la serie Operon en 22 accesiones de *D. rotundata* -*D. cayenensis* obteniendo una variabilidad del 89.2%. Asemota utilizó 10 primers de la serie G de Operon para determinar la variabilidad del germoplasma de ñame de Jamaica en donde se

estudiaron 5 especies de ñame, *D. alata*, *D. cayenensis*, *D. rotundata*, *D. trifida* y *D. esculenta*, determinando que se necesita un mínimo de 15 bandas polimórficas para separar los genotipos de la especie *D. alata* del resto de las especies.

Cabe destacar el rango del tamaño de las bandas amplificadas que fluctuó entre 0.4 kb y 1.03 kb, diferenciándose un tanto de lo reportado por Ramser *et al.*, (1996 y 1997), quienes obtuvieron bandas entre 1.0 kb y 3.0 kb y en posteriores estudios bandas de 0.4 kb a 1.3 kb y lo reportado por Asemota *et al.*, (1996), quienes obtuvieron bandas entre 0.6 kb y 1.5 kb.

Los RAPD's generados (61 bandas polimórficas) permitieron determinar la separación de dos grupos claramente definidos dentro de los 37 cultivares estudiados. Se estableció la distancia genética entre los genotipos determinándose que la mayor distancia encontrada está entre los genotipos Darién y *D. trifida* morado, resultado que era de esperarse debido a que ambos genotipos pertenecen a especies diferentes dentro del género *Dioscorea*, como lo demostró Asemota *et al.*, (1996), cuando analizaron la variabilidad genética entre 5 especies de Dioscoreas de Jamaica, ubicándose el *D. trifida*, en el dendrograma, totalmente alejado del resto de las especies. La distancia genética mas cercana fue determinada entre los genotipos Darién y Jamaica, ambos genotipos son parte de la colección del banco de germoplasma del IDIAP, en donde el genotipo Darién es considerado nativo de Panamá (PRIAG, 1997) y el Jamaica como un genotipo introducido de Las Antillas desde hace muchos años al país (IDIAP, 2002). La relación más estrecha entre estos dos genotipos quizás se deba a que ambos pertenecen a la especie *D. alata* y comparten características propias dentro de la misma especie, y que no exista influencia de la procedencia de cada uno de ellos. Sin embargo, en un estudio realizado por Cruz *et al.*, (1999), se determinó que la distribución geográfica si ejerce una pequeña influencia sobre la variabilidad de las especies de ñames, pero que sin embargo, son las características morfológicas y genéticas las que independientemente de la procedencia de los genotipos ubican las relaciones estrechas entre los grupos de germoplasma.

Las diferencias encontradas mediante los índices de similitud se aprecian con mayor claridad al analizar el dendrograma de los genotipos, en el cual se aprecia claramente la

existencia de dos grupos marcadamente diferentes en diversidad genética, conformado uno por los genotipos pertenecientes a la especie *D. trifida*, y el otro por los genotipos pertenecientes a la especie *D. alata*. Por otro lado se observa un agrupamiento muy marcado de los genotipos *D. alata* en subgrupos de acuerdo con la procedencia del genotipo. Los genotipos panameños pertenecientes al IDIAP tienen un patrón de agrupamiento compacto entre ellos ubicándose 11 de los 16 genotipos, en un mismo subgrupo, pero a la vez distanciados de los genotipos de procedencia del CATIE, los cuales se separan en dos subgrupos.

El primer grupo de genotipos del CATIE no presenta una estructura de grupo bien definida ya que en el dendrograma se observa una estructura en forma de escalera entre los genotipos, esto quizás debido a que éstos materiales han sido clasificados hasta el momento como *Dioscorea* spp. en el banco de germoplasma del CATIE al no conocerse con claridad a que especie de *Dioscorea* pertenecen. De éstos nueve genotipos, ocho son de procedencia panameña según lo sugiere el inventario de especies existente en el banco de germoplasma del CATIE, el genotipo que resta es de procedencia de Puerto Rico. Las diferencias encontradas entre éstos genotipos no son claras y la interrogante podría aclararse realizando estudios similares o más profundos incluyendo genotipos que se recolecten directamente en las regiones del país de donde proceden los genotipos que se encuentran sembrados en la finca de Cabiria del CATIE.

El segundo grupo que reúne a los demás genotipos del CATIE, es un grupo que se observa más compacto y estrechamente relacionado. En este grupo de 14 genotipos, tres son de procedencia panameña pero de diferentes regiones del país, debiendo mencionar que dos de ellos fueron introducidos en CATIE desde hace varios años y se han mantenido como germoplasma *in situ* en la finca de Cabiria, según los registros del CATIE, y el otro se mantiene en el banco de germoplasma *in vitro* del IDIAP. Los otros 12 genotipos proceden de Mayagüez, Puerto Rico y quizás es debido a esta procedencia que todos están clasificados según los registros del CATIE como pertenecientes a la especie *D. alata*, que mantienen estrecha cercanía entre ellos, corroborando lo expuesto por Cruz *et al.* (1999), en donde determina que hay diferencias notables pero no totalmente significativas en los valores de diversidad entre distintas regiones que mantengan germoplasma de *Dioscoreas* y

que por lo general los genotipos se van a agrupar mas por sus características genéticas que por la procedencia de los mismos.

La caracterización de seis genotipos de *Dioscorea alata* pertenecientes al banco de germoplasma del IDIAP permitió determinar las diferencias existentes entre éstos materiales y conocer que no todos pertenecen al mismo grupo como se pensaba inicialmente. El análisis de la matriz de similaridad permitió determinar que el genotipo Espinoso se separa por completo del resto de los cultivares, debido quizás a características de tipo heredables que se conservan en su ADN que no son compartidas con el resto de los genotipos, las cuales ya han sido mencionadas en el análisis morfológico. Entre los demás genotipos se presenta un rango de distancia promedio de 0.400 lo cual sugiere que son genotipos mas estrechamente relacionados.

El dendrograma permite observar más claramente la diversidad entre éstos genotipos en donde el genotipo Espinoso se separa nuevamente, como se observa de igual manera en la matriz de distancia, del resto de los genotipos, y se forman dos grupos claramente definidos entre los genotipos.

En un grupo se ubican los genotipos Paleta, Kabusha y Darién. Esta relación puede deberse a que posiblemente los genotipos Paleta y Kabusha son derivados del genotipo Darién, el cual ha sido utilizado por los agricultores para desarrollar híbridos que conserven las cualidades organolépticas que exige el mercado nacional.

De igual forma como éstos genotipos Paleta, Kabusha y Darién en el estudio morfológico se presentan relacionados, en el estudio molecular se presentan estrechamente relacionados, lo cual es congruente con lo manifestado por Jiménez y Aguilar ² quienes afirman que los genotipos Paleta y Kabusha derivan del genotipo Darién a partir de selecciones realizadas por los agricultores.

En el otro grupo se presentan los genotipos Diamante y Clon94. El genotipo Diamante fue introducido desde Costa Rica a Panamá en la década del 1990 (IDIAP, 2002) como material de producción destinado a la exportación el cual presentaba ventajas de tolerancia a la antracnosis, sobre los cultivares nacionales tipo baboso (característica del

tubérculo) como el Darién. El genotipo Clon94 surgió unos dos años después en la región de Ocú, Herrera, Panamá, como derivado del Diamante 6322 con las mismas características morfológicas, organolépticas y de tolerancia que presenta el genotipo Diamante. Sin embargo, no se ha determinado a ciencia cierta el origen de este genotipo en el país y es

²Jimenez Domitilo y Aguilar José Antonio. Comunicación personal, IDIAP, Panamá, 2003.

posible que la estrecha relación que se observa entre éstos dos genotipos se deba a lo explicado anteriormente, por lo que se sugieren otros estudios más detallados entre éstos genotipos y otros más que existen en el país a los cuales no se les conoce el origen ni la procedencia.

En resumen, el estudio molecular reveló que el genotipo Clon94 es estrechamente cercano con el genotipo Diamante 6322, lo que sugiere que el genotipo Clon94 puede corresponder a una selección del Diamante 6322 realizada por los agricultores para conservar características especiales como las ya mencionadas de tolerancia a la antracnosis.

Los resultados obtenidos a nivel molecular para los seis genotipos del banco de germoplasma del IDIAP, son los primeros estudios que se realizan para determinar la variabilidad genética entre poblaciones, ya que esta variabilidad es de suma importancia en el proceso de expansión natural del cultivo y en la determinación de genotipos de interés comercial y de investigación.

La comparación de las matrices de datos morfológicos y moleculares por medio de la prueba de Mantel permitió determinar que no existe asociación entre ambas matrices.

VI. Conclusiones

Para la Caracterización Morfológica

El estudio de caracterización morfológica permitió determinar el grado de variabilidad fenotípica presente entre los genotipos de las especies *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida* de la colección de germoplasma de IDIAP y del CATIE a través de la lista de descriptores utilizada. También, fue posible determinar las características que más discriminan entre genotipos, por consecuencia son las que contribuyen a explicar la mayor variabilidad observada en la población en estudio.

Se determinó las características morfológicas cuantitativas que más discriminan entre genotipos son: longitud de las espinas, diámetro del tallo, longitud de la punta de la hoja, número de ramificaciones en el tallo maduro y longitud del pecíolo de la hoja.

Los genotipos Espinoso y Diamante fueron los que mayor diversidad morfológica presentaron respecto a los genotipos Darién, Paleta, Kabusha y Clon 94.

Para la Caracterización Molecular

El método de extracción de ADN MATAB es efectivo para obtener ADN en la cantidad y calidad requerida para el análisis RAPD's en *D. alata* y *D. trifida*, al igual que la purificación del ADN por medio del uso de carbón activado como último paso en la extracción de ADN de ñame libre de mucílago.

La metodología RAPD's permitió identificar 61 marcadores polimórficos de ADN, los cuales, permitieron determinar el grado de diversidad genética presente en la población en estudio, sobre todo de los genotipos pertenecientes a la especie *Dioscorea alata*.

El análisis molecular de los 37 genotipos de *D. alata* y *D. trifida*, permitió separar claramente las dos especies, además permitió separar en dos grupos genéticamente diferentes a los tres genotipos representativos de *D. trifida* de los genotipos de *D. alata*.

El análisis molecular permitió determinar que los genotipos de la colección de germoplasma del IDIAP se separan claramente de los genotipos de la colección de germoplasma del CATIE. Los genotipos de la colección de germoplasma del CATIE se dividen en dos subgrupos, uno de los cuales presenta una estructura de grupo y el otro subgrupo no presenta una estructura de grupo definida.

El análisis molecular no permitió determinar una correspondencia entre la estructura de la diversidad genética de la población en estudio, respecto a la procedencia de los genotipos estudiados, debido a la carencia de esta última información en las colecciones de germoplasma.

La aplicación de métodos estadísticos multivariados a la información proveniente de características morfológicas y características moleculares constituye una herramienta eficaz que permite determinar relaciones de semejanza y divergencia entre poblaciones a nivel intra e inter específico.

VII. Recomendaciones

Realizar una recolección de germoplasma en Panamá para estudiarlo por características morfológicas y moleculares para determinar el grado de variabilidad genética presente al nivel de fincas de agricultores, huertos caseros y pequeños productores.

Se recomienda utilizar los descriptores morfológicos discriminantes seleccionados en este estudio, en otras poblaciones de *Dioscorea* spp, para determinar el grado de eficiencia en identificar genotipos diferentes entre poblaciones, como podría ser la colección de germoplasma del CATIE.

Por la calidad del ADN obtenido, utilizar el protocolo de extracción MATAB para la extracción de ADN de *Dioscoreas*, a partir de hojas tiernas o de plantas obtenidas del cultivo *in vitro* para futuras investigaciones

Hacer un mejor aprovechamiento de la diversidad genética presente en las colecciones de germoplasma del IDIAP y del CATIE para implementar y fortalecer los programas de investigación para la selección de genotipos útiles para los agricultores.

Realizar estudios futuros con el uso de otras técnicas de análisis moleculares como por ejemplo Fragmentos Amplificados de Longitud Polimórfica (AFLP) y Microsatélites (SSR) de acuerdo a las necesidades de los programas de investigación.

VI. Bibliografía

- Abadie, T.; A. Berretta. s.f. Caracterización y Evaluación de Recursos Fitogenéticos. Consultado 8/enero/2003. Disponible en http://www.fagro.edu.uy/dptos/bioveg/fitotecnia/Documentos/Caracterizacion_y_Evaluacion_de_Recursos_Fitogeneticos.pdf
- Alberts, B. et al. 1994. Molecular biology of the cell. Garland , NewYork-london. Pp 291-292.
- Arguedas, A. 2001. Caracterización molecular y morfológica de aislamientos del hongo *Mycena citricolor* colectados en diferentes zonas cafetaleras de Costa Rica. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa Rica. 91 p
- Asemota, H.N; ,J. Ramser; C. Lopez-Peralta; K. Weising & G. Kahl. 1996. Genetic variation and cultivar identification of Jamaica yam germplasm by random amplified polymorphic DNA análisis. Euphytica 92: 341-351.
- Becerra V. y M. Paredes. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura técnica 60(3): 270-281.
- Bieberach, C. I.; P. González; E. Quirós; M. Hernández; B. De león. 2001. Saneamiento, propagación y producción de semilla vegetativa de ñame (*Dioscorea alata* L.). Notas de investigación en Progreso. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP. 11(2):2-6.
- Centro Internacional de la Papa (CIP). 1999. Raíces y tubérculos en el sistema alimentario mundial: visión al 2020. Informe anual. Consultado 6/enero/2003. Disponible en http://www.cipotato.org/market/ARs/Ar99e/vision_e.htm
- Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 2003. Acciones de *Dioscorea* spp. ubicadas en el Banco de germoplasma *ex situ*, Cabiria, Turrialba, Costa Rica. Comunicación personal.
- Cornide, M. T. 2000. Diversidad genética y marcadores moleculares. Departamento de Bioplantas CINC. La Habana, Cuba. 150 p.
- CGIAR. 2002. Campos de investigación del CGIAR. Ñames. Consultado 10/dic/2002. Disponible en <http://www.cgiar.org/areas/yam.htm>

- Cruz V, Von Mark; N.C. Altoveros; M.S. Mendiolo and D. A. Ramírez. 1999. Geographical patterns of diversity in the Philippine edible yam collection. *Plant Genetic Resources Newsletter* n° 119: 7-11.
- Engels, J. M. 1983. A systemic description of cacao clones 1. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica* 32: 377-385
- Enríquez, G. 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. In *Técnicas para el manejo y uso de recursos genéticos vegetales*. Castillo, R.; Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito, Ecuador. p. 16-160
- _____. 1966. Selección y estudio de las características de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. Tesis Mag.Sci. Turrialba, Costa Rica, IICA. 97 p.
- Erlich, H.A. 1989. PCR technology: principles and applications for DNA amplification. New York, Stockton. 246p
- Falconer, D. 1981. Introduction to quantitative genetics. Longman, New York. 340 p.
- FAO. 2003. Estadísticas de producción de cultivos a nivel mundial. Consultado 28 noviembre, 2003. Disponible en <http://apps.fao.org/page/form?collection=Production.Crops.Primary&Domain=Production&servlet=1&language=ES&hostname=apps.fao.org&version=default>
- Franco, T.L e Hidalgo, R. (eds.). 2003. In *Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Boletín técnico n° 8, Instituto Internacional De Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p.
- Ferreira, M.E. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 1 ed. Brasilia, EMBRAPA-CENARGEN, documento 20. pp 220.
- Hamon, P & B. Touré. 1990. The classification of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis-rotundata complex*) of West África. *Euphytica* 47: 179-187.
- Hernández, R. 1997. Manejo integral del cultivo de oteo (*Xanthosoma* spp.) Una alternativa para la producción sostenible. Programa de actualización a especialistas. Módulo V. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá / Ministerio de desarrollo Agropecuario. Panamá. 45p.
- IDIAP (Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá). 1998. Recomendaciones técnicas para el cultivo del ñame. Plegable.
- _____. 1999. Recomendaciones técnicas para el cultivo del ñame. Plegable.
- _____. 2002. Listado de material vegetativo de ñame del banco de germoplasma *in vitro* del Laboratorio de Agrobiotecnología.

- IDIAP. 2002. Comunicación personal por medio de correo electrónico con el Sr. Osvaldo Cerrud realizada el 20 de noviembre 2002.
- IITA. 1997. Informe Anual 1997-1998. Anuario de la producción de IITA. FAO, vol. 50. (en línea) Consultado 1 julio 2002. <http://www.cgiar.org/iita>
- Innis, M.; Gelfand, D.; J. Sninsky; T. White. 1990. PCR protocols: A guide to methods and applications. San Diego, USA. Academic Press. 482p.
- IPGRI/IITA. 1997. Descriptores para el ñame (*Dioscorea* spp.). Instituto Internacional de Agricultura Tropical, Ibadán, Nigeria/ Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.
- Jiménez, D.; R. Hernández; J.A. Aguilar; S. Cornejo; J. López. 2002. Caracterización de germoplasma de ñame. Documento RTR-4-09 Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá.
- _____. 2001. Evaluación de diferentes densidades de siembra sobre el rendimiento y calidad en el cultivo de ñame. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá. 5 p.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. 3ª ed. Rev. y aum. San José, Costa Rica. IICA, Colección de libros y materiales educativos. 255 p.
- López V, Y.E. 1999. Caracterización morfológica y molecular de genotipos silvestres de *Quassia amara* L. Ex. Blom de Centroamérica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. Turrialba, Costa Rica
- Malaurie, B.; M. B. Trouslot; J. Berthaud; M. Bousalem; A. Pinel; J. Dubern. 1998. Medium-term and long-term in vitro conservation and safe international exchange of yam (*Dioscorea* spp.) germplasm. Nature Biotechnology vol. 1(3) (en línea) Consultado 14 sept. 2002. Disponible en <http://www.ejb.org/content/vol1/issue3/full/2/index.html#fig1>
- Mandal, R.C. 1993. Tropical Root and Tuber Crops. India, Agrobotanical Publishers. 396 p.
- Martínez W, O. 1995. Métodos estadísticos multivariados en biología molecular y su aplicación en investigación agrícola. Agronomía Colombiana. Volumen XII, nº 1 p. 66-71.
- Mendoza-Herrera, A.; J. Simpson. 1997. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. Avance y Perspectiva, Enero-Febrero. Hemeroteca Virtual Asociación Nacional de Universidades e Instituciones de Educación Superior (ANUIES) http://www.hemerodigital.unam.mx/ANUIES/ipn/avanpers/ene97/vol1608/sec_2.html

- MIDA (Ministerio de Desarrollo Agropecuario). 2000. Dirección Nacional de Agricultura de Panamá. Superficie, producción y rendimiento de yuca, ñame y oteo por región. Año agrícola 1990/91-1998/99. Mimeografiado. 4p.
- Mignouna, H.D; R.A, Mank;T.H.N, Ellis; N. Van den Bosch; R.Aseidu; S.Y.C. Ng; J.Peleman. 2002. A genetic linkage map of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* Poir) based on AFLP markers. *Theoretical Applied Genetic*. 105: 716-125.
- Montaldo, A. 1991. Cultivo de raíces y tubérculos tropicales. Segunda edición rev. San José CR. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. 408 p.
- Morales, R.; González, C; González, R; Hernández, R. 2001. Caracterización de variedades de oteo y ñame mediante análisis de isoenzimas. *Notas de investigación en progreso*. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDIAP. Año 11 (1). 9p.
- Moreno G., J. sf. Marcadores moleculares en la mejora genética de plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Madebongo. La Coruña, España. (en línea). Consultado 18 oct. 2002. <http://www.seg.umh.es/Docencia/lecciones/marcmol.htm>
- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 70: 3321-3323.
- Otero, A.; M. De la Cruz; K. Onaya. 1997. El Uso de los RAPD's como marcadores moleculares en plantas. *Boletín de la Sociedad Botánica de México*. 60:85-117.
- Phillips-Mora, W.; H., Rodríguez; P., Fritz. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Turrialba, Costa Rica, CATIE 183 p. Serie técnica. Informe técnico no. 252.
- Phillips-Mora, W. 1998. Biología molecular y marcadores moleculares en la agricultura. Memoria II Congreso Nacional de Estudiantes del sector Agropecuario Costarricense. IICA-EARTH-CATIE. p. 77-87
- Poot-Matu, J.E; M.A, Mijangos Cortés. 2000. Serie Técnica de raíces y tubérculos N° 3, 5 y 6. Tabasco, México.
- PRIAG. 1997. Eds. Jaen, B; A. Silva; M. Hernández. Programa Regional de Reforzamiento a la Investigación Agronómica sobre Granos en Centroamérica. Parcelas adaptativas de dos cultivares de ñame con tecnología de reproducción comercial en El Potrero y Guararé, Panamá. Informes técnicos. Arco Seco, Panamá. San José, Costa Rica. p. 57-63
- Purseglove, J.W. 1972. *Tropical Crops; Monocotyledons*. London Longmans. 607 p.
- Ramser, J.; C. Lopez-Peralta; R. Wetzel; K. Weising and G. Kahl. 1996. Genomic variation and relationships in aerial yam (*Dioscorea bulbifera* L.) detected by random amplified polymorphic DNA. *Genome* vol. 39:17-25.

- Ramser, J; W. Terhalle and R. Terauchi. 1997. Molecular marker based taxonomy and phylogeny of Guinea yam (*Dioscorea rotundata* – *D. cayensis*). Genome vol 40: 903-915.
- Rodriguez, S. 1980. Estudio comparativo de clones de ñame (*Dioscorea alata*) en las condiciones de Cuba. Agrotécnia de Cuba 12(2):115-124.
- Rodríguez, W. 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Mesoamericana 11(2): 133-152
- Rojas, M.; J. Concepción; K. VonChon. 1997. Manejo integral del cultivo del ñame mecanizado (*Dioscorea alata*). Una opción para la producción sostenida. Programa de actualización a especialistas. Módulo V. Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá / Ministerio de desarrollo Agropecuario. Panamá. 45p.
- Rojas, W. 2003. Análisis de la variabilidad genética en quinua. In Análisis estadística de datos de caracterización morfológica de recursos fitogenéticos. Franco, T.L y R. Hidalgo, eds. Boletín Técnico nº 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. p. 27-39
- Sánchez, C; Hernández Vásquez, L.P. s.f. Descripción de Aspectos Productivos, de Postcosecha y de Comercialización del Ñame en Córdoba, Sucre y Bolívar. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria Regional Dos. CORPOICA. Consultado 19/nov/2002. Disponible en <http://www.turipana.org.co/index.htm>
- Valls, J. 1989. Caracterizacáo morfológica, reproductiva e bioquímica de germoplasma vegetal. In Curso de Tecnología de Sementes para Bancos de Germoplasma. CENARGEN, Brasilia. 23p
- Vásquez , S. A. 1998. Estudio de la variabilidad genética a nivel molecular y cuantitativo de seis procedencias de caoba (*Switenia macrophylla* King.) del área de Centroamérica y México. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, CATIE. Turrialba, Costa Rica. 93p.
- Weising, K.; Nybom, H.; Wolf, K.; Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press Incl. Boca Ratón, Florida.
- Welsch, J. Y McClelland, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucl. Acids Researcher 18 (24): 7213-7218.
- Williams, JKG.; AR., Kubelik; KJ., Livak; JA., Rafalski; SV., Tingey. 1990. DNA Polimorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acid Research 18 (24). 6531-6535
- Wilson, L.A. 1977. Root Crops, In Alvin,P.T; Kozłowski, T.T. eds. Ecophysiology of Tropical Crops. New York, Academic Press. p. 187-236.

Anexo 1

Descriptorios morfológicos para Dioscóreas

Descriptorios para dioscoreáceas.

CARACTERÍSTICAS DEL TALLO	DESCRIPCIÓN
Días hasta el brote	Numero de días entre la plantación y el brote
Longitud del tallo	Registrada 20 días después del brote
Número de entrenudos del tallo	Contados 20 días después del brote
Color del tallo	Registrado 20 días después del brote con escala de color: 1. verde; 2. verde morado; 3. verde marrón; 4. marrón oscuro; 5. morado.
Cera en tallo joven (si, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Alas en el tallo joven (si, no) Color de las alas en tallo joven	Mediante ausencia (0) y presencia (1) Por escala de colores: 1. verde; 2. verde con bordes morados; 3. morado; 4. especificar color
Pubescencia del tallo (si, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Espinas en el tallo (si, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
TALLO DE 30 DÍAS	
Mancha de color en la base de la espina (a 30 días)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Trozos cortezudos en el tallo (a 30 días)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
TALLO MADURO	
Tipo de planta	Por código numérico: 1. enana; 2. tipo arbusto; 3. trepadora
Viabilidad de la planta	Por código numérico: 3. baja; 5. intermedia; 7. alta
Hábito de trepado de la planta	Por código numérico: 0. No; 1. Si
Modalidad de trepado de la planta	1. sentido de las agujas del reloj (trepado hacia la izquierda)

	2. contra reloj (trepado hacia la derecha)
Altura del tallo maduro	1. ? 2 m; 2. 2-10 m; 3. ? 10 m
Número del tallos maduros/planta	Conteo de los tallo maduros
Color del tallo maduro	Por escala de colores: 1. verde; 2. verde morado; 3. verde marrón; 4. verde oscuro; 5. morado.
Número de entrenudos hasta la 1ª ramificación	Observado en el tallo maduro
Número ramificaciones en el tallo maduro	Registrar el número de ramas sobre la superficie
Diámetro del tallo	Medido a 15 cm sobre la base del tallo
Forma de la sección transversal del tallo en la base	Por código numérico: 1. cuadrada; 2. cuadrangular; 3. octogonal; 4. redonda; 5. otro
Longitud de los entrenudos (cm)	Registrada a una altura de 1 m. Promedio de cinco plantas
Cera en el tallo maduro (sí, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Alas en el tallo (sí, no) Posición de las alas	Mediante ausencia (0) y presencia (1) 1. en la base 2. sobre la base
Tamaño de las alas (mm)	Registrado a la altura de 1 m: 1. ? 1 mm 2. 1-2 mm 3. ? 2 mm
Color de las alas	Por escala de color: 1. verde; 2. verde con bordes morados; 3. morado; 4. otro
Cresta en el tallo maduro (sí, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Pilosidad en el tallo	Por escala numérica: 3. escasa 7. densa
Tipo de pelos en el tallo maduro	Por escala numérica: 1. radial; 2. en forma de T; 3. sencillo; 4. otro
Superficie rugosa (sí, no)	Por código numérico: 0. No; 1. Si
Hojas escamadas (sí, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Posición de hojas escamadas en el tallo	Por escala numérica: 1. alternadas; 2. opuestas; 3. ambas; 4. verticiladas
Espinas en la base del tallo	Por escala numérica: 3. pocas; 7. muchas
Espinas arriba de la base del tallo	Por escala numérica: 3. pocas; 7. muchas
Posición de las espinas del tallo maduro	Por escala numérica: 1. alas; 2. crestas; 3. tallo
Forma de las espinas	Por escala numérica: 1. derechas; 2. curvadas hacia arriba; 3. curvadas hacia abajo
Longitud de las espinas	Media de 20 espinas situadas aproximadamente entre 0,5 y 1,5 m de la longitud del tallo: 3. corta; 5. intermedia; 7. larga
Espinas coalescentes en el tallo (sí, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)
Color de la mancha en la base de la espina	Por escala de color: 1. roja; 2. morada; 3. marrón;

CARACTERÍSTICAS DE SUCEPTIBILIDAD	DESCRIPCIÓN
Descriptores de la planta	Por escala numérica: 3. baja, 5. intermedia; 7. alta
Susceptibilidad a antracnosis	Por escala numérica: 3. baja, 5. intermedia; 7. alta
Susceptibilidad a bacteriosis	Por escala numérica: 3. baja, 5. intermedia; 7. alta
Susceptibilidad a Fusarium	Por escala numérica: 3. baja, 5. intermedia; 7. alta

CARACTERÍSTICAS DE LA HOJA	DESCRIPCIÓN
Descriptor/ Variedades	
Primer brote de las hojas	1. temprano 2. tardío
Número de hojas (a los 30 días)	Registrado 30 días después del brote
Color de la hoja	Por escala de color: 1. amarillento; 2. verde claro; 3. verde oscuro; 4. verde morado; 5. morado; 99. otro
Color del borde las hojas jóvenes	Por escala de color: 1. verde; 2. morado; 99. otro
Color de la nervadura de hojas jóvenes	Por escala de color: 1. amarillento; 2. verde; 3. morado claro; 4. morado; 99. otro
Color del pecíolo de hojas jóvenes	Por escala de color: 1. todo verde con la base morada; 2. todo verde con la junta de la hoja morada; 3. todo verde morado en ambas puntas; 4. todo verde morado con base morada; 5. todo verde morado con junta de la hoja morada; 6. todo verde morado con ambas puntas moradas; 7. verde; 8. morado; 9. verde marrón; 10. marrón; 11. marrón oscuro.
Color del ala del pecíolo de la hoja joven	Por escala de color: 1. verde; 2. verde con bordes morados; 3. morado; 99. otro
Pilosidad del haz /envés de la hoja joven	Por código numérico: 1. haz; 2. envés; 3. ambas
Forma de la hoja madura	Por código numérico: 1. oval; 2. cordiforme; 3. cordiforme larga; 4. cordiforme ancha; 5. sagitiforme larga; 6. sagitiforme ancha; 7. hastada
Forma del ápice	Por código numérico: 1. obtuso; 2. agudo; 3. emarginado; 99. otro
Ondulación de la hoja	Por código numérico: 3. poca; 7. mucha
Distancia entre los lóbulos de la hoja	Por código numérico: 1. sin distancia; 2. intermedia; 3. muy distante
Hojas maduras dobladas hacia arriba a lo largo del nervio medial	Por código numérico: 3. poco doblada; 7. muy doblada
Hoja madura arqueada hacia abajo a lo largo del nervio medial (sí, no)	Por código numérico: 0. No; 1. Sí
Lóbulos de la hoja arqueados hacia abajo (sí, no)	Por código numérico: 0. No; 1. Sí
Medida de la hoja madura (cm)	Observada en 20 hojas adultas tomando ancho y largo
Posición de la parte más ancha de la hoja madura	Por código numérico: 1. tercio superior; 2. medio; 3. tercio inferior
Longitud de la punta de la hoja (mm)	Por código numérico: 1. ? 2 mm; 2. 2-5 mm; 3. ? 5 mm
Color de la punta de la hoja	Por escala de color: 1. verde claro; 2. verde oscuro; 3. verde morado; 4. roja
Longitud del pecíolo de la hoja	Por código numérico: 1. ? 5 cm; 2. 6-9 cm; 3. ? 10 cm
Longitud del pecíolo en relación con el limbo de la hoja	Por código numérico: 3. corto (? 2); 5. intermedio (=2); 7. largo (? 2)
Pilosidad del pecíolo de la hoja	Por código numérico: 3. escasa; 7. densa
Color del pecíolo de la hoja	Por escala de color
Color del ala del pecíolo de la hoja	Escala: 1. verde; 2. verde bordes morados; 3. morado
Espinosidad el pecíolo de la hoja	Por código numérico: 3. escasa; 7. densa
Estípulas en la hoja (sí, no)	Mediante ausencia (0) y presencia (1)

Anexo 2

Análisis de suelo

Resultados de análisis de laboratorio

N° Labort.	N° muestra	Color del suelo	A.L arc %	pH	Fosforo Ug/ml	Potasio Ug/ml	Calcio Ug/ml	Aluminio Ug/ml	Magnesio Meq/100ml	M.O. %	Manganeso Ug/ml	Hierro Ug/ml	Zinc Ug/ml	Cobre Ug/ml	Textura
1785	Fertilidad	Pardo fuerte	14-18-42	6.3	4	102	0.25	0.3	0.24	3.35	13	11	1	2	ARC
1786	Densidad	Pardo fuerte	40-20-40	5.3	4	98	0.29	0.3	0.28	5.09	23	19	2	3	ARC
Interpretación del análisis															
				pH	Fosforo	Potasio	Calcio	Aluminio	Magnesio	M.O.	Manganeso	Hierro	Zinc	Cobre	
				Poco ácido	Bajo	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	
				ácido	Bajo	Medio	Bajo	Bajo	Bajo	Medio	Medio	Bajo	Bajo	Medio	
Recomendaciones															
			Nutrientes (Lbs/ha)			Fertilizante a aplicar		Aplicación							
	Cultivo		Nitrógeno (N)	Fosforo (P ₂ O ₅)	Potasio (K ₂ O)	Fertilizante	Cantidad	Época							
	Ñame		45	45	45	15-15-15	3 qq/ha	20-35 días después de la siembra							
			14	--	44	Nitrato de potasio	1 qq/ha	60-70 días después de la siembra							

Anexo 3

Protocolo de Extracción de ADN (MATAB)

- 1.- Colocar en un Mortero un disco de hoja de un cm de diámetro (Punta de espátula).
- 2.- Agregar 700 ul de tampón de Extracción SORBITOL + BISULFITO DE SODIO frío, macerarlo con un pistilo hasta obtener un macerado uniforme, añadir 700 ul del mismo tampón y decantar en un tubo Eppendorf de 2 ml de capacidad.
 - NOTA: Corregir el pH con NaOH hasta obtener un pH 7.5
- 3.- El disco de hoja macerado se centrifuga a 5000 RPM durante 10 minutos a 0°C.
- 4.- Decantar el sobrenadante, escurrir y se suspender el precipitado en 700 ul de tampón MATAB. Se agita brevemente con el vortex.(En esta fase los tubos se pueden congelar y continuar con el paso siguiente posteriormente (Paso 5)
- 5.- Los tubos conteniendo el ADN incubar durante 2h a 65°C en un Baño de Maria.
- 6.- Agregar a cada tubo 400 ul de cloroformo alcohol isoamilico (CIAA) a la relacion 24:1, y hacer una emulsión y centrifugar a 5000 RPM durante 10 minutos.(o 7000 RPM en centrífuga grande)
- 7.- Recuperar la fase acuosa en un nuevo tubo conteniendo 300 ul de RNA-ase, e incubar los tubos por 30 minutos a 37°C (Baño de Maria).
- 8.- Precipitar el ADN agregar 800 ul de isopropanol frío, agitando por inversión el tubo eppendorf y se coloca por espacio de dos horas en el congelador a -20°C.
- 9.- Centrifugara a 6000 RPM durante 10 minutos, vaciar y escurrir el sobrenadante. Observando la presencia de un precipitado (Pelet). Secar al ambiente por 2 horas.
10. Lavar el precipitado con etanol al 70%, agregando 1000 ul para luego dejar en reposo por el espacio de 10 minutos (Agitar en un vortex).
11. Centrifugar a 8000 RPM / 10 minutos, a 0°C.
12. Secar el precipitado por una hora en un liofilizador y resuspender en agua ultra pura (200 ul), usando el vortex para disolver el precipitado y dejar 1 hora en solución, (Se puede dejar a 4 °C por una noche).
- 13.- Posteriormente verificar la concentración de ADN en un gel de agarosa al 0.8 %.

Anexo 4

Preparación de soluciones para protocolo MATAB

Tampón de extracción Sorbitol+Bisulfito de Sodio.(debe prepararse en el momento de ser usado)

Sorbitol 0,35M; Tris 100 mM; EDTA 5mM; Bisulfito de sodio 0,5% pH 8,0

Reactivo/sustancia	1 L	2 L	100 ml
Sorbitol	63,7 g	127,5 g	6,37 g
Tris-HCL 1M pH 8,0	100 ml	200ml	10 ml
EDTA 0,5M pH 8,0	10 ml	20 ml	1 ml
	-----	-----	-----
Aforar con agua destilada a	1000 ml	2000 ml	100 ml

Tampón de lisis MATAB (se almacena en botella color ambar)

Tris 100mM; NaCL 1,25 mM; EDTA 20mM; MATAB 4% pH 8,0

Reactivo/sustancia	1 L	2 L	100 ml
Tris-HCL 1M pH 8,0	100 ml	200 ml	10ml
NaCL	73 g	146 g	7,3 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml	80 ml	4 ml
	-----	-----	-----
Agua (para completar el volumen)	1000 ml	2000 ml	100 ml

Anexo 5

Protocolo para el análisis de RAPD.

1. Rotular los tubos para termociclador y colocar en una gradilla o cubeta con hielo picado.
2. Adicionar a cada tubo las siguientes sustancias en las siguientes proporciones:
20mM Tris-HCL (pH 8.4)
50mM KCL
2mM MgCL₂
0,2 mM dNTPs
0.8 μM primers
0,06 U/μL Taq ADN polimerasa
2 ng de ADN de estudio
25μL de volumen final en la reacción
Cerrar los tubos con sus respectivas tapas y colocar en el termociclador
3. Esperar aproximadamente de 3 a 4 horas que dura el programa de amplificación mencionado en materiales y métodos. Dejar enfriar aproximadamente por 15 min. a 4°C.
4. Una vez finalizado el proceso, las muestras son sometidas a una electroforesis en gel de agarosa.

Anexo 6

Preparación de gel de agarosa.

Reactivos:

TBE, 1X Buffer	110 ml
Agarosa	0,9 g

Colocar esta solución en el Microondas por el espacio de 4 minutos.

Pasos Previos.

Antes de la preparación del gel de agarosa se debe realizar los siguientes pasos:

- Arreglar la bandeja, colocándolo en un recipiente, se ubican los peines.
- Agregar bromuro de etidio 3 a 4 veces presionando la tapa de la botella que lo contiene y evitando salpicar fuera de la cubeta. (Altamente toxico). Esperar a retirar el erlemeyer del Microondas
- Retirar el vaso químico del Microondas usando un guante de caucho, de forma inclinada con la boca hacia fuera del cuerpo con el objeto de evitar absorber los gases emitidos por este.
- Agregar el contenido del erlemeyer en forma circular sobre la bandeja conteniendo el Bromuro de etidio a fin de distribuirlo uniformemente.
- Colocar los peines en las ranuras de las bandejas
- Esperar a que el gel solidifique (Aproximadamente 20 minutos).
- Retirar los peines
- Colocar la solución conteniendo el ADN en el gel
- Conectar la cámara a la fuente de poder y dejar correr por espacio de 20 minutos.

Anexo 7

Matriz de Similitud de 37 genotipos de ñame (*Dioscorea* spp. y *D. trifida*) de las colecciones de germoplasma del CATIE y el IDIAP, generada a partir de datos moleculares por el Jaccard's Coefficient

	D. t mor	D.t blanco	D. t Pma	7231	Paleta	Espin	Coco	Jamaica	Cabuya	Darién	Criollo bab.	Dia 6322	Blanco P	Clon94	Cristal	Mano T	6319	6323	6324	
D. t mor	1,000																			
D.t blanco	0,536	1,000																		
D. t Pma	0,607	0,840	1,000																	
7231	0,143	0,188	0,180	1,000																
Paleta	0,268	0,293	0,310	0,610	1,000															
Espin	0,175	0,200	0,220	0,298	0,357	1,000														
Coco	0,200	0,222	0,239	0,478	0,641	0,405	1,000													
Jamaica	0,208	0,255	0,271	0,412	0,581	0,370	0,842	1,000												
Cabuya	0,167	0,190	0,209	0,432	0,595	0,286	0,794	0,711	1,000											
Darién	0,143	0,188	0,204	0,458	0,500	0,356	0,700	0,846	0,658	1,000										
Criollo bab	0,208	0,255	0,271	0,412	0,545	0,340	0,707	0,850	0,757	0,800	1,000									
Dia6322	0,191	0,213	0,229	0,429	0,404	0,298	0,511	0,636	0,500	0,628	0,674	1,000								
Blanco P.	0,268	0,325	0,310	0,435	0,442	0,357	0,422	0,388	0,439	0,404	0,417	0,320	1,000							
Clon94	0,225	0,220	0,238	0,400	0,341	0,317	0,419	0,383	0,474	0,400	0,444	0,615	0,475	1,000						
Cristal	0,237	0,231	0,250	0,419	0,390	0,333	0,475	0,400	0,459	0,419	0,432	0,525	0,541	0,742	1,000					
Mano T	0,159	0,209	0,200	0,413	0,452	0,366	0,658	0,558	0,657	0,585	0,595	0,413	0,525	0,487	0,474	1,000				
6319	0,200	0,195	0,186	0,409	0,450	0,205	0,429	0,391	0,447	0,378	0,422	0,442	0,349	0,486	0,472	0,541	1,000			
6323	0,200	0,162	0,184	0,302	0,333	0,205	0,350	0,318	0,361	0,302	0,349	0,400	0,268	0,400	0,424	0,342	0,655	1,000		
6324	0,222	0,302	0,318	0,380	0,444	0,277	0,489	0,614	0,409	0,605	0,578	0,408	0,444	0,265	0,333	0,422	0,271	0,250	1,000	

Continuación anexo 7

	6324	6326	6327	6328	6344	6345	6346	6347	6348	7064	7066	7248	7291	7305	7311	7332	7333	7363	6667
6326	0,444	1,000																	
6327	0,306	0,326	1,000																
6328	0,244	0,395	0,368	1,000															
6344	0,333	0,525	0,364	0,576	1,000														
6345	0,286	0,538	0,255	0,500	0,595	1,000													
6346	0,362	0,649	0,364	0,5760,765		0,639	1,000												
6347	0,347	0,537	0,348	0,5000,771		0,605	0,824	1,000											
6348	0,300	0,476	0,356	0,5140,649		0,622	0,605	0,703	1,000										
7064	0,333	0,452	0,429	0,444	0,579	0,553	0,667	0,771	0,605	1,000									
7066	0,479	0,478	0,396	0,4390,675		0,500	0,675	0,683	0,581	0,595	1,000								
7248	0,319	0,405	0,349	0,2820,450		0,390	0,415	0,500	0,513	0,450	0,444	1,000							
7291	0,267	0,286	0,293	0,184	0,233	0,238	0,233	0,310	0,421	0,293	0,304	0,645	1,000						
7305	0,378	0,405	0,261	0,2500,450		0,357	0,415	0,463	0,405	0,450	0,413	0,333	0,342	1,000					
7311	0,234	0,310	0,256	0,278	0,200	0,293	0,256	0,273	0,279	0,317	0,271	0,238	0,270	0,130	1,000				
7332	0,313	0,463	0,229	0,3080,439		0,381	0,475	0,525	0,395	0,475	0,500	0,500	0,444	0,462	0,359	1,000			
7333	0,348	0,311	0,318	0,351	0,349	0,267	0,349	0,333	0,341	0,261	0,548	0,436	0,342	0,244	0,238	0,390	1,000		
7363	0,362	0,452	0,364	0,405	0,463	0,513	0,463	0,476	0,488	0,463	0,426	0,526	0,395	0,415	0,350	0,513	0,450	1,000	
6667	0,311	0,366	0,250	0,2370,447		0,286	0,341	0,357	0,333	0,310	0,378	0,359	0,231	0,262	0,256	0,350	0,233	0,341	1,000
6324	6326	6327	6328	6344	6345	6346	6347	6348	7064	7066	7248	7291	7305	7311	7332	7333	7363	6667	

