



**INSTITUTO NACIONAL AUTÓNOMO DE
INVESTIGACIONES AGROPECUARIAS
ESTACIÓN EXPERIMENTAL SANTA CATALINA**

FECHA DE PRESENTACIÓN: Enero 2011

ESTACIÓN EXPERIMENTAL: Santa Catalina

PROGRAMA/DEPARTAMENTO: Biotecnología

PROYECTO: Innovaciones para emprendimiento de camote en la seguridad, soberanía alimentaria y oportunidades de mercado en el Ecuador (SENACYT Código 2407).

RESULTADOS: Caracterización molecular de germoplasma

ACTIVIDAD: Caracterización molecular de la colección nacional de camote (*Ipomoea spp.*) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante marcadores microsatélites

UBICACIÓN: Estación Experimental Santa Catalina

AUTOR: Egda. María Gabriela Basantes Lasso

COAUTORES: Dr. Eduardo Morillo (EESC)
Ing. Gloria Cobeña (EEPO)

COLABORADOR: Dpto. Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF)

FECHA DE INICIO: Octubre 2010

FECHA DE TERMINACIÓN: Septiembre 2011

PRESUPUESTO: \$ 9604,64

FINANCIAMIENTO:

INIAP (Dpto. Biotecnología):	33%
Proyecto SENACYT:	24,50 %
Tesista	42,50%

1. ANTECEDENTES

El camote es una raíz reservante descrita por Linneo en 1753, y cuyo nombre científico más reciente es *Ipomoea batatas* (L.) (Huamán, 1992). La expansión geográfica del camote, se inició en el continente europeo, y posteriormente a África, India, Sureste de Asia y las Indias Orientales, alcanzando luego Nueva Guinea, las islas del Pacífico Oeste, China y Japón (Yáñez, 2002). El camote es una planta perenne, propagada vegetativamente y hexaploide ($2n=6x=90$) (Huamán, 1992).

Sobre su origen, se han reportado al menos 13 especies silvestres consideradas como parientes silvestres o ancestros del camote (Huamán, 1992). Austin (1988), basado en análisis numéricos de caracteres morfológicos en camote, había postulado que el camote se habría originado en la región entre la Península de Yucatán, en México, y el Río Orinoco, en Venezuela. Estudios más recientes, basados en marcadores moleculares AFLPs, determinaron que la mayor diversidad se encuentra en América Central (Zhang *et al.*, 1998). Además, considerando que la mayor riqueza de especies silvestres del género *Ipomoea* se encuentra en este continente, se confirmó que América Central es el centro de origen del camote. Estos estudios fueron posteriormente confirmados por Zhang *et al.* (2000) mediante marcadores microsatélites. Por otro lado, se han reportado centros secundarios de diversidad genética (áreas geográficas donde el cultivo evolucionó separadamente de sus ancestros) como la región comprendida entre Perú y Ecuador (Zhang *et al.*, 1998). También se ha observado una considerable variabilidad genética en algunas islas del Pacífico y Asia, tales como Filipinas, Papúa Nueva Guinea, Sri Lanka, Australia, entre otras (Díaz *et al.*, 1992).

En relación a sus usos, el camote es principalmente utilizado como fuente de alimentación humana, por su alto contenido de calorías, vitaminas y minerales (Ponce & Cano, 2009), constituyéndose en el séptimo cultivo alimenticio de importancia que se siembra a nivel mundial, después del trigo, arroz, maíz, papa, avena y yuca (CIP, 1999).

En Ecuador, el camote se cultiva en todas sus regiones desde cerca del nivel del mar hasta 2800 msnm, con una superficie cosechada de 260 Ha y con un rendimiento promedio de 2,26 TM /Ha, para el año 2000. La región de la Costa se ha constituido por muchos años como la principal productora de este cultivo, sin embargo, condiciones climáticas no favorables han hecho que en los últimos años se reduzca su área de producción (Alvarado *et al.*, 2009). En Manabí, según el Ministerio de Agricultura, Acuicultura y Pesca (MAGAP) en el año 2008 por efecto del exceso de lluvia se perdieron 81Ha de camote (Diario Manabí, 2008).

Existe en la actualidad una amplia base genética de camote en bancos de germoplasma como el del Centro Internacional de la Papa (CIP). Estas colecciones permiten preservar la variabilidad y evitar la erosión genética (De la Puente, 1988; Fuglie, 2007). En Ecuador, según, Jorgensen & León (1999), los recursos genéticos que posee el género *Ipomoea* en nuestro país, comprende 48 especies nativas, de las cuales tres serían especies endémicas. Estos materiales son de uso potencial por ser fuente de genes de interés para el mejoramiento genético del camote cultivado por transferencia de caracteres específicos deseables (Yáñez, 2002), razón por la que se están incrementando los esfuerzos en la caracterización y prospección de especies silvestres en los bancos de germoplasma (Parrado *et al.*, 2008).

En el INIAP, existe el interés institucional para el mejoramiento genético del camote (Knudsen, 2000). El proyecto "Innovaciones para emprendimiento de camote en la seguridad, soberanía alimentaria y oportunidades de mercado en el Ecuador", está ejecutando la introducción, recolección, mantenimiento, identificación y caracterización del material germoplásmico de camote de diversas provincias de país (INIAP, 2010). Además el Banco Nacional de Germoplasma conserva materiales recolectados a nivel nacional, existiendo en la actualidad un registro de 27 especies del género *Ipomea* organizadas en Colección Base y Colección de campo (INIAP, 2010). Estos materiales son objeto del presente estudio, utilizando herramientas moleculares disponibles para la caracterización genética de camote.

Como antecedentes del uso de marcadores moleculares en camote, Buteler *et al* (1999), reporta la transferibilidad de 9 primers SSRs en *Ipomoea trifida*. Zhang *et al* (2000) probaron 12 primers SSRs en el análisis de la diversidad genética de variedades de camote provenientes de Latinoamérica que forman parte del germoplasma mantenido por el CIP, en donde 113 accesiones de 10 países fueron agrupadas en tres regiones. Este trabajo concluyó que Mesoamérica es el centro primario de diversidad y probablemente el centro de origen del camote, mientras que Perú-Ecuador se consideran como un centro secundario de diversidad. En los últimos años se reporta mayor investigación en el desarrollo de marcadores moleculares para camote. Hu *et al*, (2004), diseñaron 102 primers microsatélites para la caracterización molecular de 20 accesiones de camote, reportando 27 primers altamente polimórficos. Veasey *et al*, (2008), investigó la diversidad genética de 78 accesiones de camote de 19 comunidades locales de Sao Paulo-Brasil mediante marcadores moleculares SSRs. Para el análisis se utilizaron 11 pares de primers SSRs, de los cuales 8 primers provenían de la librería genómica de Buteler *et al*, (1999). Los resultados obtenidos determinaron que los primers diseñados por Buteler *et al*, 1999 registraron un alto nivel de polimorfismo determinándose una alta diversidad genética entre los materiales en estudio.

2. JUSTIFICACIÓN

A pesar de que trabajos anteriores reportan al Ecuador como centro de diversidad genética del camote, no existen reportes de caracterización molecular de sus recursos genéticos y a pesar de su importancia, esta especie está poco estudiada en comparación con otras raíces y tubérculos. Este trabajo aportará al conocimiento de los recursos genéticos del camote y especies silvestres, las cuales podrán utilizarse en futuros programas de mejoramiento genético con perspectivas de transferencia de caracteres deseables a la forma cultivada de camote.

El uso de marcadores moleculares nos permitirán conocer las diferencias genéticas existentes en la colección nacional de camote, a través de la obtención de un perfil molecular característico para cada material, la misma que servirá en la identificación y discriminación de individuos, información sumamente necesaria en estudios de identificación de los parentales, control de cruzamientos y estudios de diversidad y distancia genética. Además de proporcionar un mejor conocimiento de la variabilidad genética existente, los marcadores moleculares permitirán identificar duplicados en el Banco de germoplasma, facilitando el manejo de estos últimos, al establecer un set de materiales representativos para trabajos de uso o conservación de germoplasma, sin que represente una pérdida significativa al patrimonio genético de la colección. Asimismo, la disponibilidad de datos de caracterización fenotípica o morfológica de la colección permitirá relacionar la información con los datos moleculares.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar molecularmente la colección nacional de camote (*Ipomoea spp.*) del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP mediante marcadores moleculares microsatélites (SSRs).

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

3.2.1 Caracterizar molecularmente 59 accesiones de la colección nacional de camote (*Ipomoea batatas* L) y 36 accesiones de especies silvestres del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP, utilizando 12 *primers* SSRs polimórficos previamente reportados.

3.2.2 Comparar las diferencias genéticas presentes a nivel de polimorfismo y heterocigosidad en los genotipos de camote (*Ipomoea batatas* L.) y especies silvestres colectadas en el Ecuador.

3.2.3 Identificar las relaciones genéticas existentes en el germoplasma caracterizado, para la identificación taxonómica de especies silvestres conservadas en el banco de germoplasma del INIAP.

3.2.4 Correlacionar estadísticamente los datos moleculares con las características morfológicas de las accesiones pertenecientes a la colección nacional de camote.

3.2.5 Apoyar a la consolidación de una colección nacional de camote para el INIAP.

4. HIPÓTESIS

4.1 No existe variabilidad genética en la colección nacional de camote (*Ipomoea spp.*) revelada por los marcadores moleculares SSRs

4.2 No existe afinidad genética entre especies de camote cultivado (*Ipomoea batatas* L.) y silvestres.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. MATERIALES

5.1.1. Material Vegetal

Se realizará la caracterización molecular de 59 accesiones cultivadas y 36 accesiones de especies silvestres de camote provenientes del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP. En el caso de los materiales de camote cultivado, una parte de estos provienen de las provincias del Azuay, Napo y Morona Santiago y se encuentran sembrados bajo condiciones de campo en la Estación Experimental Portoviejo–EEP (INIAP); mientras que los materiales provenientes de la provincia de Orellana (Coca) se encuentran sembrados en la Estación Experimental Central de la Amazonía. Por otro lado, los materiales provenientes de la provincia de Manabí y otros repatriados del CIP se encuentran en el invernadero del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF).

En cuanto a los materiales silvestres, se obtendrá semilla sexual del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP, para posteriormente ser sembradas en el invernadero del Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos (DENAREF). Por cada material de la colección camote, se tomará muestra de una planta y se identificará con un código de laboratorio, mientras que para los materiales silvestres se tomará muestra de dos plantas. En el anexo 1, se muestran las colecciones de camote y especies silvestres del género *Ipomoea* que serán analizadas en el presente estudio.

5.1.2. Material de laboratorio, equipos y reactivos

El material de laboratorio, equipos y reactivos que serán utilizados se encuentran detallados en el anexo 2.

5.2 METODOLOGÍA

5.2.1 Características del laboratorio

La caracterización molecular de la colección de camote y especies silvestres del género *Ipomoea* se realizará en el Laboratorio de Biología Molecular del Departamento Nacional de Biotecnología de la Estación Experimental Santa Catalina, INIAP.

5.2.2 Manejo Específico del Experimento

5.2.2.1 Germinación de semilla sexual de especies silvestres

Esterilización de la superficie: La desinfección de las semillas botánicas se realizará mediante el siguiente protocolo (Kameswara *et al*, 2007):

1. Se sumergirá las semillas durante 1 minuto en una solución de alcohol al 70%.
2. Posteriormente se realizará una inmersión en Hipoclorito de sodio al 2% por 10 minutos.
3. Se realizará un enjuague de las semillas con agua estéril por 1 minuto, repitiendo el proceso 4 veces.

5.2.2.2 Método de germinación sobre papel

Las semillas germinarán sobre papel absorbente húmedo, en recipientes con tapas bien ajustadas para evitar la pérdida de humedad, los recipientes más comúnmente son las cajas petri (Kameswara *et al*, 2007).

1. Esterilizar el material a utilizar y a continuación colocar papel absorbente en la parte inferior de la caja petri.
2. Se agregará un volumen adecuado de Acido giberélico a una concentración de 500 ppm.
3. Colocar las semillas de manera uniforme sobre la superficie del papel de modo que no queden en contacto. Tapar las cajas petri para evitar la entrada de aire.
4. Colocar las cajas petri en una germinadora a una temperatura óptima para la germinación de la especie (25-30°C).
5. En el caso de que algunas semillas no hayan germinado y se encuentren todavía en periodo de dormancia, se tratará con técnicas apropiadas para la ruptura de la dormancia de las semillas.

6. Una vez germinadas las semillas botánicas, serán sembradas bajo condiciones de invernadero.

5.2.2.3 Ruptura de la dormancia de las semillas

Los 3 métodos que serán utilizados para la interrupción de la dormancia son (Kameswara *et al*, 2007):

1. **Escarificación manual:** La escarificación manual es efectiva en cualquier punto de la testa de la semilla, y consiste en perforar, cortar, pelar o raspar la testa con un cuchillo, aguja o una lija. Se debe evitar la región micropilar, ya que es la parte más sensible de la semilla donde se ubica la radícula.
2. **Uso de temperatura:** Antes de la germinación, las semillas se someten a una temperatura que no excede los 40°C durante un periodo de siete días, en un lugar donde circula aire libremente.
3. **Acido giberélico:** El papel de la prueba de germinación se humedecerá con una solución de Acido giberélico con una concentración de 500 ppm.

5.2.2.4 Extracción de ADN

La extracción del ADN genómico se realizará a partir de hojas jóvenes (de preferencia primordios foliares). Se utilizarán los protocolos de extracción de ADN genómico reportados por (Doyle & Doyle, 1990) con modificaciones (Borgues *et al*, 2009) específico para muestras frescas, y el protocolo reportado por (Dellaporta *et al*, 1983) con modificaciones (Elías, 2004) para el caso de muestras en seco. La metodología de los protocolos mencionados se detalla en el anexo 3. Posteriormente se realizará la cuantificación del ADN obtenido por fluorescencia con bromuro de etidio para la estimación de su concentración en ng/μl (anexo 4). Previa a la amplificación, el ADN total de las muestras, será homogenizado a una concentración de 5 ng/μl. Las soluciones de ADN normalizadas serán validadas mediante la amplificación con un primer RAPDs (Morillo, 2002).

5.2.2.5 Genotipaje de microsatélites: Para la detección de los microsatélites (SSRs) se empleará el método "M13-tailing", que consiste en adicionar a los primers forward de cada uno de los 12 SSRs (Anexo 5) la secuencia e M13 (19pb) en el extremo 5', la cual será incorporada durante los ciclos de amplificación, marcándose de esta manera los productos PCR. En el anexo se detalla los primers SSRs utilizados para este estudio. En la reacción PCR también se incorporará un fluoróforo que excitará a 685 nm ("IRD 700") o a 785 nm ("IRD 800"), de manera que los productos amplificados, al ser separados por electroforesis, puedan ser detectados simultáneamente por los dos canales del genotipador LI-COR DNA Analyzer 4300S, generándose dos imágenes de corrida en tiempo real, una en 700 nm y otra en 800 nm. Estas imágenes serán posteriormente procesadas en un software de lectura y registro de datos SAGA GT 4200-507- LI-COR Biosciences (Morillo *et al*, 2009).

El coctel de reacción PCR se realizará en un volumen final de 10 μl con una concentración final de 0.5 Buffer PCR (500 mM TRIS pH=8,5, 10 mM KCl, 2mM MgCl₂, 500 mg/ml BSA), 1μM de dNTPS, 0.1μM de primer Fw-M13, 0.3 μM de primer Rv, 1 μM de M13-IrDye 700 u 800, 0,6 U de Taq y 30 ng de ADN genómico. En el anexo 6 se detalla los volúmenes de cada componente en el coctel de reacción. La amplificación se realizará en un Termociclador Biometra a gradiente empleando un ciclo de

desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, seguido de 25 ciclos de amplificación a 94 °C por 20 segundos, temperatura de alineamiento (°C) por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos y un ciclo final de extensión a 72 °C por 3 min. Terminada la PCR, se realizará la denaturación de los productos amplificados a 94°C por 3 minutos y enseguida serán colocados en hielo. Posteriormente, los productos de amplificación se diluirán con 5 µl de Blue stop, cargándose 0.8 µl de esta solución en un gel de acrilamida al 6%. Primero se cargarán las muestras a 800 nm y luego de correr tres minutos se cargan las muestras a 700 nm. La electroforesis se realizará a 1500 V durante 90 minutos en el LI-COR DNA Analyzer 4300S. Una vez finalizada la corrida, el LI-COR DNA Analyzer 4300s creará y guardará las imágenes del gel en archivos formato TIFF (800 y 700 nm), para que pueda ser interpretado por el software SAGA –GT 4200-507- LI-COR Biosciences, el cual realizará un registro de los datos obtenidos (Morillo *et al*, 2009).

5.2.2.6 Estandarización de las condiciones de genotipaje: Se realizarán pruebas de estandarización de las condiciones de amplificación de los 12 primers microsatélites (SSRs) seleccionados, con el fin de determinar posteriormente combinaciones que amplifiquen simultáneamente microsatélites en un mismo mix PCR (multiplex). Las condiciones que se tomarán en cuenta para realizar las combinaciones son: distintos tamaños (pb), marcaje de fluorescencia (IRDye) y temperatura de alineamiento iguales. Las pruebas de estandarización consistirán en amplificar microsatélites con cada uno de los primers forward con marcaje de fluorescencia (IRDye) a 700 y 800 nm. Posteriormente se seleccionará los mejores productos de amplificación para un determinado marcaje.

5.2.2.7 Análisis Estadístico: El software SAGA GT-SSR efectuará la lectura de las imágenes proporcionadas por el LI-COR 4300s, en donde se obtendrá una matriz de datos genotípicos y binarios, para posteriormente ser examinados con programas estadísticos los siguientes parámetros:

Distancias genéticas: Se utilizará el programa software PowerMarker versión 3 (Liu & Muse, 2005), el cual convertirá la matriz de datos genotípicos en una matriz de frecuencia con datos binarios (1 y 0), con la finalidad de obtener una matriz de distancia mediante la opción alelos compartidos (*Distancia de alelos compartidos, DAC*).

Análisis de agrupamiento: La matriz binaria será importada al programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2002) para realizar un análisis de agrupamiento. Se calculará la matriz de similitud utilizando el coeficiente SM y posteriormente mediante la aplicación “*clustering*” opción SAHN se obtendrá el dendograma UPGMA que representará las relaciones entre genotipos a través de un gráfico comparativo. El dendograma serán visualizados en el programa TREEVIEW 1.6.6 (Page, 2001).

Análisis de duplicados: La matriz genotípica será analizada con un macro de Excel denominado Microsatellite (Park, 2001), el cual identificará muestras idénticas según la información genética que presenten.

Diversidad genética: Se utilizará el programa PowerMarker versión 3 (Liu & Muse, 2005) en donde se analizará los siguientes parámetros de diversidad:

- Tamaño de la muestra. Número de observaciones
- Disponibilidad
- Frecuencia alélica
- Genotipos

- Número de alelos
- Porcentaje de loci polimórficos
- Coeficiente de inbreeding dentro de la población (f)
- Heterocigosis Observada (H_o)
- Heterocigosis Esperada (H_E)
- Contenido de información de polimorfismo (PIC)
- Alelos exclusivos

Métodos Multivariados: Permite determinar las relaciones entre las accesiones dependiendo de la posición en que se disponen en el espacio, mientras más cerca se encuentran entre sí dos accesiones más estrechamente relacionadas están. Dentro de estos métodos se encuentra el Análisis de Coordenadas Principales (PCO). Para realizar el PCO se utilizará el software NTSYS ver.2.1 (Rohlf, 2002).

Estadísticas F: Las estadísticas F son tres: FIS (coeficiente de consanguinidad o endogamia intrapoblacional), FIT (coeficiente de consanguinidad total) y FST (coeficiente del co-ancestro).

Para calcularlas se utilizará el programa FSTAT v. 2.9.3.2 (Goudet, 2001), para lo cual se transformará la matriz genotípica (de tallas de alelos) a un formato fst por medio del programa GENETIX v. 4.03 (Belkhir *et al.*, 2000).

Análisis Molecular de Varianza: El análisis molecular de varianza (AMOVA) determina la diferenciación genética entre poblaciones y dentro de las poblaciones. El AMOVA se calculará por medio de programa GenALEx ver. 6 (Peakall y Smousse, 2005).

6. CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

Actividades	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12
Entrenamiento en laboratorio e investigación bibliográfica	X	X	X									
Aprobación del proyecto				X								
Germinación de semilla				X								
Siembra de materiales en campo e invernadero				X								
Extracción, cuantificación y validación de ADN.				X	X							
Screening de SSRs					X							
Estandarización del genotipaje						X						
Genotipaje SSRs en LI-COR 4300S							X	X				
Registro de datos								X	X			
Análisis estadístico e interpretación										X	X	X
Correlación de datos moleculares con agro morfológicos.												X
Identificación taxonómica de especies silvestres												X
Apoyo a la consolidación de la colección nacional de camote.												X
Redacción manuscrito										X	X	X

7.1 PRESUPUESTO

Cuadro 7.1: Costos de la caracterización molecular a realizarse en el presente estudio.

ACTIVIDAD	COSTO (\$)	CANTIDAD	TOTAL (\$)
Extracción ADN (1-18 muestras)	15	6	90.00
Cuantificación ADN (1-20 muestras)	15	6	90.00
Genotipaje SSR-M13 Tailing (12 Locus)	191	12	2292.00
Corrida LI-COR 4300S	56	12	672.00
Estandarización del genotipaje	150	1	150.00
Síntesis de primers	75	12	900.00
SUBTOTAL			4194,00
IVA 12%			503,28
TOTAL			4697,28

Cuadro 7.2: Rubro-Recursos humanos (Tesista)

Técnico	Costo mensual	Meses	TOTAL (\$)
Tesista	340,00	12	4080,00

Cuadro 7.3: Costos en la elaboración de ejemplares del proyecto final

ACTIVIDAD	UNIDAD	CANTIDAD (\$)	UNIDAD (\$)	TOTAL (\$)
Fotocopias, impresión y otros	hojas	500	0,5	250,00
Empastados.	Und.	6	20	120,00
TOTAL				370,00

Cuadro 7.4: Costo total del proyecto de caracterización molecular de la colección de camote (*Ipomoea batatas L*) y especies silvestres.

ETAPA	COSTO (\$)	FUENTE FINANCIAMIENTO
Recurso Humano	4080,00	Tesista
Caracterización Molecular	4697,28	Biotecnología/Proyecto SENACYT
Elaboración documento final	370,00	Biotecnología
Subtotal	9147,28	
Imprevistos (5%)	457,36	Biotecnología
TOTAL	9604,64	

FUENTE DE FINANCIAMIENTO	Aporte
INIAP (Dpto. Biotecnología)	33,00%
Proyecto camote	24,50%
Tesista	42,50%
TOTAL	100,00%

8. BIBLIOGRAFÍA

- Austin, D.F. (1988). The taxonomy, evolution and genetic diversity of sweetpotatoes and related wild species. Exploration, maintenance, and utilization of sweetpotato genetic resources. International Potato Center, Lima. 27-60.
- Alvarado, K., Flores, A., López, M. (2009). Creación del Bróker MKV para la exportación de camote y otros productos agrícolas no tradicionales a España. 1 : 19-24, 29-33, 36-42.
- Belkhir K, et al. (2000). GENETIX, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II. Montpellier (France).
- Borgues, A., Silva, M., Recchia, G. (2009). CTAB methods for DNA extraction of sweetpotato for microsatellite analysis. 66:529-534.
- Buteler, M. Jarret. (1999). Sequence characterization of microsatellites in diploid and polyploid *Ipomoea*. Theoretical and Applied Genetics. 99:123-132.
- Centro Internacional de la Papa. (1999). La batata en cifras. Extraído el 23 de enero, 2011, de <http://www.cipotato.org/Espanol/camote/camote>
- De la Puente, F. (1988). Recursos genéticos de batata (camote) en el CIP. En: Memorias del seminario sobre mejoramiento de la Batata (*Ipomoea batatas*) en Latinoamérica. Centro Internacional de la Papa. 173-202
- Diario Manabí. (2008). Pérdidas agrícolas en el cultivo de camote. Extraído el 23 de enero, 2011, de <http://www.el-diario.com.ec/noticias-manabí-ecuador/27330-cuantifican-las-perdidas-agricolas>.
- Díaz, J., F. De la Puente y D. Austin. (1992). Enlargement of fibrous roots in *Ipomoea section batatas* (Convolvulaceae). 46 (3), 322-329.
- Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J. (1983). A plant DNA minipreparation: version II. Plant Molecular Biology Reporter, v.1, 19-21.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. 12:13-15.
- Elias, M., Muhlen, G. (2004). Genetic Diversity of traditional South American landraces of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) : an analysis using microsatellites. 58: 242-256
- Fuglie, K.O. (2007). Priorities for sweetpotato research in developing countries: results of a survey. HortScience 42(5), 1200-1206.
- Goudet. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponible en <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>
- Hu, J., Nakatani, M., Mizuno, K., Fujimura, T. (2004). Development and Characterization of microsatellite markers in sweetpotato. Breeding science 54:177-188.
- Huamán, Z. (1992). Botánica sistemática y morfología de la planta de batata o camote. Boletín de Información Técnica 25, Centro Internacional de la Papa. 0256-8667: 7-25.
- INIAP, (2010). Banco Nacional de Germoplasma del INIAP- Santa Catalina. Departamento Nacional de Recursos Fitogenéticos y Biotecnología (DENAREF). Extraído el 8 de diciembre, 2010, de <http://www.iniap.gov.ec>.
- Jørgensen, P.M. & León, S. (1999). Catalogue of the Vascular plants of Ecuador. Monograph. Syst. Bot. Missouri Bot. Gard. 0-915297-60-6.
- Kameswara, N., Handson, M., Dulloo, E. (2007). Manual para el manejo de semillas en Bancos de Germoplasma. 978-92-9043-757-4.
- Knudsen, H. (2000). Directorio de Colecciones de Germoplasma en América Latina y el Caribe. Primera edición. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). 92-9043-416-3.

- Liu, K., & Muse, S. (2005). Power Marker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 21(9), 2128-2129.
- Morillo, E., Mino, G., García K. (2009). Caracterización molecular de 150 accesiones de yuca (*Manihot esculenta* crantz) para la identificación de duplicados. Departamento Nacional de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Estación Experimental Santa Catalina.
- Morillo, E. (2002). Protocolos de Marcadores Moleculares. Departamento nacional de recursos filogenéticos y biotecnología (DENAREF). Estación experimental "Santa Catalina".
- Page, R. (2001). TreeView 1.6.1.6. Disponible en: <http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>
- Park, S. (2001). Microsatellite. Genetics Dept, TCD, Ireland.
- Parrado, O., Caballero, P., Pérez, R. (2008). Los recursos genéticos de *Ipomoea spp* (Convolvulaceae) en la provincia de Pinar del Rio, Cuba. Universidad Pedagógica José Martí. CP 74-670.
- Peakall, R. Y Smouse, P. (2005). GenAIEx 6: Genetic Analysis in Excel. The Australian National University. Canberra, Australia.
- Ponce, M., Cano, Evelyn. (2009). Creación de una empresa Productora y exportadora de Chifles de camote en la ciudad de Manta – Ecuador. Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí. Facultad de Ciencias Administrativas.
- Rohlf J. (2002). Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.1. Department of Ecology and Evolution State University of New York. New York-United States of America.
- Veasey, Elizabeth Ann; Silva, M., Bressan, E.(2008). Caracterización morfológica de las variedades locales de camotes dulces (*Ipomoea batatas* L.) recolectadas en los campos de la agricultura tradicional en el Valle de Ribeira. 03:00703-0.
- Yáñez, V. (2002). Aislamiento y Caracterización de Marcadores Moleculares microsatélites a partir de la construcción de Librerías Genómicas enriquecidas de camote (*Ipomoea batatas* L). 1:1-108.
- Zhang, D.P., Ghislain, M., Huaman, Z., Cervantes, J., Carey, E. (1998). AFLP assessment of sweetpotato genetic diversity in four tropical American regions. CIP Program Report. 303-310.
- Zhang, DP., Carbajulca, D., Ojeda, L., Rossel, G., Milla, S., Herrera, C., Ghislain, M. (2000). Microsatellite analysis of Genetic diversity in sweetpotato varieties from Latin America. CIP Program Report, 295-301.

ANEXOS

Anexo 1. Colección de camote y especies silvestres del Banco Nacional de Germoplasma del INIAP

Colección CIP

Código	Procedencia	Colección/ Variedad	Nombre cultivar
1	CIP 190023.59	SR 90.323	San Ramón 59
2	CIP 192033.50	INA-100	INA
3	CIP 400002	DLP613	Morado-Ecuador
4	CIP 401466	CC 89.213	CC89.213
5	CIP 420014	Jonathan	Jonathan
6	CIP 420027	Zapallo	Zapallo
7	CIP 420759	DLP 1621	Morado – Perú
8	CIP 440031	NCSU240	Jewell (USA)
9	CIP 440034	BDI Mohc	Mohc
10	CIP 440045	SPV55	Toquecita
11	CIP 440230	Satsumahitari	Satsumahitari (Japón)
12	CIP 440396	BNAS WHITE	Philipino
13	CIP 441700	RCB IF-6	Morado- Brasil; IAC-225-Roxa

Colección Gualaquiza (Morona Santiago)

Código	Procedencia	Nombre cultivar
14	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Yun Kum Inchi
15	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Shuar Inchi
16	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Inchi Pujo blanco
17	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Camote morado
18	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Camote de chicha
19	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Tsun Inchi
20	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Mamma Ajuntei
21	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Tsun Ki Inchi
22	Colección Gualaquiza - Morona Santiago	Doce para

Colección Azuay

Código	Procedencia	Nombre cultivar
23	Colección Azuay	Rojo temprano
24	Colección Azuay	Don Bosco
25	Colección Azuay	Algodón
26	Colección Azuay	Blanco del Mercado
27	Colección Azuay	De Méndez
28	Colección Azuay	Morado Peruano
29	Colección Azuay	Pata de Chinote
30	Colección Azuay	Peruano Rosado
31	Colección Azuay	Yema de huevo
32	Colección Azuay	Ramón
33	Colección Azuay	La Leona

Colección Manabí

Código	Procedencia	Nombre cultivar
34	Colección Manabí	MTCG 001 Guayaco sin flor
35	Colección Manabí	MTCG 002 Guayaco con flor
36	Colección Manabí	MTCG 004 Papa Camote
37	Colección Manabí	MTCG 005 Anaranjado
38	Colección Manabí	MTCG 006 Guayaco morado
39	Colección Manabí	MTCG 007 Guayaco
40	Colección Manabí	MTCG 008 Guayaco
41	Colección Manabí	MTCG 009 Arrecho
42	Colección Manabí	MTCG 010 Morado
43	Colección Manabí	MTCG 011 Morado
44	Colección Manabí	MTCG 012 Peruano
45	Colección Manabí	MTCG 013 Guayaco Morado
46	Colección Manabí	MTCG 015 Papa Camote
47	Colección Manabí	MTCG 018 Perilla
48	Colección Manabí	MTCG 19 Crema

Material Introducido (Napó)

Código	Procedencia	Nombre cultivar
49	Material introducido-Napó	Tena

Material Orellana (Coca)

Código	Procedencia	Colección/ Variedad	Código Banco
50	Colección Coca	----	ECU 17593
51	Colección Coca	----	ECU 17594
52	Colección Coca	----	ECU 17595
53	Colección Coca	----	ECU 17596
54	Colección Coca	----	ECU 17597
55	Colección Coca	----	ECU 17598
56	Colección Coca	----	ECU 17599
57	Colección Coca	----	ECU 17600
58	Colección Coca	----	ECU 17601
59	Colección Coca	----	ECU 17602

Colección de camotes silvestres

Código	Procedencia	Nombre	Código Banco
60	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp.</i>	ECU 1714
61	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea ramosissima</i>	ECU 1773
62	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea rubens</i>	ECU 5122
65	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea asarifolia</i>	ECU 5128
66	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea asarifolia</i>	ECU 5130
69	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 6654
70	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 7856
72	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea reticulata</i>	ECU 1747
73	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 1746
74	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 1757
75	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 1774
76	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 3769
77	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 5136
78	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 5276
79	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 5576
80	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 6655
81	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 6687
82	Banco Germoplasma	<i>Ipomoea spp</i>	ECU 7857

Anexo 2: Materiales, equipos y reactivos a utilizarse en el presente proyecto.

MATERIALES DE LABORATORIO Y OTROS	
Papel filtro	Separadores/peines
Tubos eppendorf 0,5 ml y 1.5 ml	Vaso de precipitación 10cc y 50cc
Hielo picado	Probetas 10cc, 50cc y 2000cc
Pistilos para macerar	Erlenmeyer 250 cc
Puntas para micropipeta 1ul, 200 ul y 1000 ul	Espátula
Parafilm	Gradilla
Papel toalla	Placas PCR
Micropipetas	Pinzas
Papel aluminio	Rulimanes para molienda
Hot plate	Cinta adhesiva
Cajas petri	Lija

EQUIPOS DE LABORATORIO	
Baño maria	Estufa
Centrifuga	Sorbona
Vortex	Balanza analítica
Refrigerador	DNA Analyzer 4300S LI-COR
Fotodocumentador	Sellador de placas PCR
Termociclador	Micro estufa para tubos eppendorf
Cámaras de electroforesis	Autoclave
Microondas	Equipo para molienda
Germinador de semillas	

REACTIVOS	
EDTA	Aceite mineral
NaCl	Marcador 100 bp
Tris HCl pH 8	Marcador Low Mass Ladder
CTAB	Marcaje IRDye 700 y 800 nm
B-mercaptoetanol	Agua ultrapura
CIA	Tampón TE
Etanol helado (75%)	ARNasa
Isopropanol helado	Agua de tartrazina
Bromuro de etidio	Blue juice 1x y 10x
Agua destilada	Agarosa
Taq polimerasa	Tampón TAE 1X
Solución Blue stop LICOR	MgCl ₂
Tampón TAE 50X	10XPCR buffer
Primers (forward y reverse)	dNTP's
Acido giberélico	

Anexo 3: Protocolos de extracción en fresco y seco de ADN genómico de la colección de camote (*Ipomoea batatas* L) y especies silvestres

Anexo 3.1: Protocolo de extracción en fresco de ADN genómico de la colección de camote (*Ipomoea batatas* L) y especies silvestres

Borges *et al* (1999)

1. Colocar las hojas de camote (aproximadamente 50 mg) en tubos eppendorf de 1,5 ml, y a continuación añadir 400 ul Buffer de extracción al 2% de CTAB con modificaciones (20 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH 8, 1.4 M NaCl, 2% CTAB), mas 1% de B-mercaptoetanol, el cual será añadido antes de usar la Buffer de extracción.
2. Se da vortex a los tubos por 10 segundos y se incuba a 60°C por 30 minutos.
3. Añadir a los tubos 60 ul de CIA (24:1), se da vortex por 10 segundos y a continuación se centrifuga a 10,000 rpm por 3 minutos. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo.
4. Repetir el paso 3 nuevamente.
5. Añadir Isopropanol frío (-20°C) al sobrenadante recuperado (0.7 del volumen total de sobrenadante recolectado), se realiza una agitación de la muestra por inversión, y se centrifuga a 10,000 rpm por 3 minutos. Observar el pellet de ADN adherido al tubo eppendorf y eliminar la fase líquida.
6. Realizar un lavado del pellet con 500 ul de etanol al 70% y se seca el pellet por 12 horas a temperatura ambiente (los tubos son colocados en forma invertida en papel filtro).
7. Disolver el pellet en 100 ul de buffer TE (Tris – HCl 1mM, EDTA 0.1 mM, pH 8), colocar los tubos a baño maría a 65°C. A continuación añadir 5ul de RNASE (10mg/ml), e incubar a 37°C por una hora.
8. Conservar el ADN a 4°C hasta su cuantificación.

Anexo 3.2 Protocolo de extracción en seco de ADN genómico de la colección de camote (*Ipomoea batatas* L) y especies silvestres del género *Ipomoea*

Elias *et al* (2004)

1. Secar hojas jóvenes en sílica gel o mediante una estufa a 45°C por un periodo de 72 horas. Moler la muestra hasta su pulverización y colocar en tubos eppendorf a una temperatura de -20°C antes de su uso.
2. Colocar las hojas de camote (aproximadamente 50 mg) en tubos eppendorf de 1,5 ml, y a continuación añadir 800 ul de Buffer de extracción al 3% de CTAB con modificaciones (30 mM EDTA, 0,1 M Tris HCl pH 8, 1.2 M NaCl, 3% CTAB), mas 3% de β-mercaptoetanol, el cual será añadido antes de usar la Buffer de extracción.
3. Dar vortex a los tubos e incubar a 65°C por 1 hora, realizando una adecuada homogenización de las muestras cada 15 minutos.

4. Añadir a los tubos 500 ul de CIA (24:1), se da vortex por 1 minuto y a continuación se centrifuga a 8,000 rpm por 10 minutos.
5. Transferir 500 ul de sobrenadante a un nuevo tubo, y colocar una igual cantidad de CIA (24:1) más 200 ul de CTAB al 3% (sin -mercaptoetanol). Se da vortex y se centrifuga nuevamente a 8,000 rpm por 10 minutos. Se transfiere nuevamente 500 ul del sobrenadante a un nuevo tubo y se coloca 350 ul de isopropanol frío a 20°C.
6. Realizar una agitación de los tubos por inversión y centrifugar los tubos a 8,000 rpm por 10 minutos.
7. Observar el pellet de ADN adherido al tubo eppendorf y eliminar la fase líquida.
8. Disolver el pellet en 200 ul de buffer TE (Tris – HCl 1mM, EDTA 0.1 mM, pH 8), colocar los tubos a baño maría a 65°C. A continuación añadir 4ul de RNASE (10mg/ml) e incubar a 37°C por una hora. Almacenar el ADN a 4°C hasta su cuantificación.

Anexo 4: Cuantificación de ADN genómico de la colección de camote (*Ipomoea batatas L*) y especies silvestres

La concentración de ADN genómico será determinado mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE 1X y cuantificado comparativamente utilizando el estándar ADN *Low Mass Ladder* (10068-013 INVITROGEN®). Se dejará correr la electroforesis durante 30 minutos a 100 voltios, seguido de la tinción del gel con una solución de Bromuro de etidio (15 ppm) por aproximadamente 30 minutos.

Finalmente se visualizará las bandas en el Fotodocumentador UV Dolphin View. De acuerdo a la estimación de la concentración de ADN, se estandarizará la concentración de ADN de todas las accesiones, a 5 ng/ul con agua de tartrazina, para posteriores pruebas de amplificación mediante PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa).

4.1 Preparación de geles de agarosa

1. Pesar la cantidad de agarosa requerida de acuerdo al volumen de la cámara a utilizarse, y colocarla en un frasco.
2. Adicionar el volumen de Tampón TAE 1X necesario
3. Disolver la solución de agarosa en el microondas, dejar enfriar por pocos minutos.
4. Colocar al molde cinta adhesiva en los bordes y sellar bien
5. Colocar el peine adecuado en el molde
6. Verter la agarosa sobre el molde y dejar solidificar
7. Retirar el peine del molde
8. Colocar el gel en la cámara de electroforesis y cubrirlo con Tampón TAE 1X.

Anexo 5: Amplificación de microsatélites del ADN genómico de la colección de camote (*Ipomoea batatas L*) y especies silvestres

Para el análisis se realizó la selección de 12 primers microsatélites publicados por Huamani *et al* (2009) y Hu *et al* (2004), cuyas características se encuentran detalladas a continuación:

Autor	SSRs	Tamaño (pb)	T ° Annealing
Huamani (2009)	IbE 27	100-130	57
Huamani (2009)	IbE 14	85-110	57
Huamani (2009)	IbE 5	210-220	60
Huamani (2009)	IbY 46	126-144	55
Hu (2004)	IBSSR 27	149	60
Hu (2004)	IBSSR 04	216	60
Hu (2004)	IBSSR 10	177	60
Hu (2004)	IBSSR 19	181	65
Hu (2004)	IBSSR 25	130	60
CIP (2009)	IbN34	251-292	55
CIP (2009)	IbN18	188	59
CIP (2009)	IbN37	140-195	55

Anexo 6: Cóctel de reacción para amplificación de la colección de camote y especies silvestres con marcadores microsatélites

Reactivos	Concentración	Rx (1)
Buffer Gotaq	5X	1.5 ul
MgCl ₂	25 mM	0.6 ul
dNTPs	10 mM	0.15 ul
Primer Fw	10 uM	0.375 ul
Primer Rv	10 uM	0.375 ul
GoTaq	5 U/ul	0.1ul
H ₂ O	hp	2.4 ul
ADN	5ng/ul	2 ul