



WAGENINGEN UNIVERSITY
WAGENINGEN UR



**CURSO SOBRE:
USO DE MARCADORES MOLECULARES
EN EL MEJORAMIENTO GENETICO
DE LAS PLANTAS**

Organizado por

Departamento de Mejoramiento Genético
Universidad de Wageningen Holanda

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
INIAP, Ecuador

Fundación PREDUZA-WU

Abril 16 a Mayo 11 2007
Quito, Ecuador

PREDUZA, es una fundación sin fines de lucro, establecida por la Universidad de Wageningen, Holanda, dedicada a mejorar las condiciones de vida y bienestar de las comunidades agrícolas andinas y a la capacitación de técnicos de las instituciones nacionales vinculados al sector agrícola. PREDUZA es ejecutado por el Laboratorio de Mejoramiento de Plantas de la Universidad de Wageningen

Dirección de la Fundación PREDUZA
Avs. Eloy Alfaro y Amazonas.
Edificio del Ministerio de Agricultura y Ganadería, cuarto piso, oficina 401
Quito, Ecuador
Tel-fax: 593-2-2500316
e-mail: angela@preduza.org web: www.preduza.org

**CURSO SOBRE:
USO DE MARCADORES MOLECULARES
EN EL MEJORAMIENTO GENETICO
DE LAS PLANTAS**

Organizado por

Departamento de Mejoramiento Genético
Universidad de Wageningen, Holanda

Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias
INIAP, Ecuador

Ejecutado por
Fundación PREDUZA-WU

Abril 16 a Mayo 11, 2007
Quito, Ecuador

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

César Tapia B.

INIAP, Estación Experimental Santa Catalina; Panamericana Sur km. 1, Quito - Ecuador. Casilla postal 17-01-340. Tele-fax: (593 2) 2 693359. Correo electrónico: denaref@ecnet.ec

Introducción

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

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

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

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

Al ser una leguminosa fijadora de nitrógeno y poseer altos contenidos del insecticida natural 'rotenona' en las semillas (Sørensen, 1996), es una opción interesante para ser usada en agricultura orgánica y sistemas de producción principalmente como cultivo de cobertura, para mejorar las condiciones del suelo y

controlar malas hierbas. La extracción de la rotenona podría convertirse en un subproducto del cultivo, pues se ha demostrado su capacidad para el combate de trips, áfidos y larvas de mosca blanca (Sørensen, 1988), lo que podría ser usado en el manejo integrado de plagas.

El CATIE inició en 1985 una colección que actualmente incluye 180 entradas de *Pachyrhizus* spp., creada bajo el marco del 'Cambean Project' y constituida por materiales provenientes principalmente de Meso y Suramérica.

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

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

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

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

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

Tamaño de la muestra

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

promedio de la muestra está dentro del rango del 5% de la media verdadera de la población.

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

Para los caracteres cualitativos se determinó que los tamaños mínimos de muestra oscilaron entre una y tres muestras. En el caso de los caracteres cuantitativos la variación fue muy grande, como se muestra en el Cuadro 1; presentando con una precisión del 5% valores tamaños de muestras entre 1363 y 20 para los caracteres grosor de la corteza de la raíz y L/A del foliolo de la hoja, respectivamente. Además del coeficiente de variación de cada descriptor, en este cuadro se incluye, el tamaño mínimo de muestra usando cuatro diferentes límites de error (5, 10, 25 y 50%), lo cual es un indicativo de la precisión con que se desee trabajar. Para mantener un nivel de confianza grande, en esta investigación se seleccionaron límites de confianza inferiores al 25%. Con base en la experiencia adquirida en el ensayo de campo, se decidió además que el tamaño máximo de muestras idealmente no debería superar las 60, sobre todo en aquellos caracteres que fueran más laboriosa la toma de datos como largo y ancho de raíz, botones florales por inflorescencia, número de hoja

Cuadro 1. Tamaño de muestra mínima de caracteres cuantitativos a diferentes límites de error según la fórmula de Steel y Torrie (1980) de la colección de *P. tuberosus* del CATIE, 1998.

Descriptor	Tamaño de muestra (probabilidad al 5%) Límite de error			
	5%	10%	25%	50%
<i>V. cuantitativas</i>				
Días floración	85	21	3	1
Largo flor	149	37	6	2
Ancho flor	95	24	4	1
Número ramas	489	122	19	5
Ramas/inflorescencia	479	120	19	5
Inflorescencia/rama	147	37	6	2
Botones/inflorescencia	298	74	12	3
Largo estambres	200	50	8	2
Largo tallo	68	17	3	1
Número nudos	105	26	4	1
Largo foliolo	594	148	24	6
Ancho foliolo	182	45	7	2
L/A hoja	20	5	1	0
Número hojas	140	35	6	2
Ancho raíz	284	71	11	3

Cuadro 1 Continuación

Descriptor	Tamaño de muestra (probabilidad al 5%) Límite de error			
	5%	10%	25%	50%
Largo raíz	583	146	23	6
L/A raíz	122	30	5	1
Grosor corteza	1363	341	54	14
Peso raíz	334	84	13	3
Grados brix	439	110	18	4
Días madurez	50	12	2	0
Largo vaina	331	83	13	4
Ancho vaina	74	18	3	1
L/A vaina	149	37	6	2
Número vainas	781	195	31	8
Número lóbulos	323	80	13	3
Número semillas	260	65	10	3
Peso semilla	539	135	21	5
Largo semilla	213	53	8	2
Ancho semilla	233	58	9	2
L/A semilla	423	105	17	4
% materia seca	122	31	5	1
Número raíces	301	75	12	3

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

Caracterización Morfológica

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

Se evaluó 31 entradas de *P. tuberosus* fueron sembradas en un Diseño Completamente al Azar con 35 repeticiones. Cada unidad experimental estuvo constituida por una planta. El área total de ensayo fue de 1015 m², con una distancia de siembre de 1,0 m, colocando dos semillas por golpe al momento de la siembra para luego ralea a una planta, 20 días después. Se evaluó 35 plantas por entrada. La colección fue manejada sin fertilización y con combates fitosanitarios (combate de virus) durante su ciclo de cultivo.

Se utilizó la lista original de descriptores de jícama (Morera, 1992) de la Unidad de Recursos Fitogenéticos del CATIE, modificada por Márquez (1992) y se concluyó además modificaciones basadas en la morfología propia de la especie. En el flujograma de la Fig. 1 se observa los análisis estadísticos realizadas para la caracterización morfológica.

Variabilidad genética de la colección de *P. tuberosus*

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

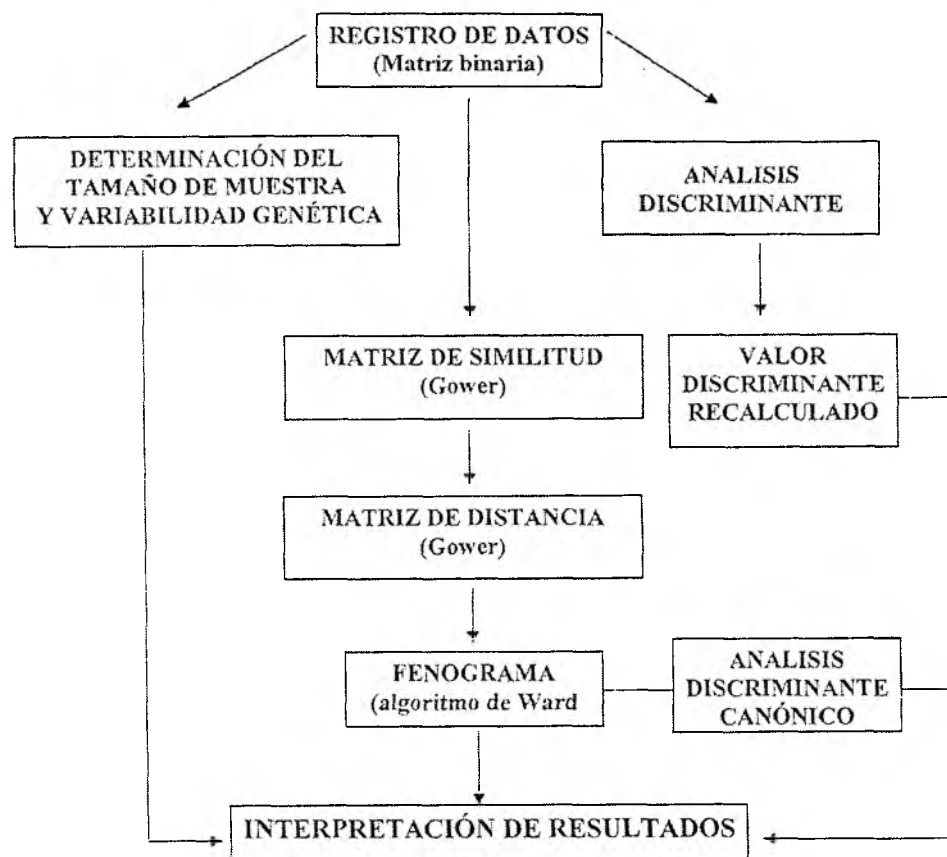


Fig. 1 Flujograma del análisis estadístico e los datos morfológicos de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

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

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

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

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

Agrupamiento de las entradas

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

Ward (1963) produjo cuatro grupos diferentes, tres de los cuales coinciden con la clasificación etnobotánica propuesta por Sørensen (1996). Se formó un cuarto grupo formado únicamente por ashipas. Es así, que las entradas del grupo 1 (G1) corresponden a las denominadas ashipas, el grupo 2 (G2) a los chuines, grupo 3 (G3) a las jíquimas y el grupo 4 (G4) a cuatro entradas ashipas (Cuadro 3).

Cuadro 3. Distribución de las entradas por grupo, según el análisis de agrupamiento jerárquico de Ward. CATIE, 1998.

<u>GRUPO 1</u> (Ashipas)	<u>GRUPO 2</u> (Chuines)	<u>GRUPO 3</u> (Jiquimas)	<u>GRUPO 4</u> (Ashipas)
TC063	TC353	TC238	TC531
TC118	TC354	TC239	TC534
TC210	TC355	TC538	TC535
TC352	TC359	TC551	TC556
TC525	TC361	TC552	
TC526	TC362	TC553B	
TC530	TC554C	TC554N	
TC533A		TC555	
TC533B			
TC550			
TC553A			

Valor discriminante de los caracteres para separar grupos

Caracteres cualitativos

De los 24 caracteres analizados mediante la prueba de X^2 (Cochram, 1954), se detectó 19 de ellos con alta significancia (1%), uno con significancia al 5% y solamente cuatro no significativos (Cuadro 4). Estos resultados indican que existe un gran número de descriptores que hacen un importante aporte para separar los cuatro diferentes grupos genéticos, pues además presentaron altos coeficientes de asociación. En el mismo Cuadro se indica 10 caracteres elegidos por su mayor valor discriminante, que pueden utilizarse para establecer diferencias entre grupos genéticos.

Cuadro 4. Caracteres cualitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de *P. tuberosus*, CATIE, 1998

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

^a = Caracteres elegidos como los más discriminantes para separar los tres grupos genéticos □ ashipas, chuines y jíquimas

** = Significativo al 1% de probabilidad
ns = no significativo

* = Significativo al 5% de probabilidad

La forma y el tipo de lóbulo del foliolo central de la hoja fueron los caracteres con el mayor valor discriminante (59,2 y 53,1 respectivamente) y con los más altos coeficientes de asociación. La forma de la semilla presentó un valor de X² (43,3) y el mayor valor según la prueba de Cramer (Kendall y Stuart, 1979) (0,89), por lo tanto, tiene una alta contribución para discriminar entre grupos genéticos, al igual que los dos anteriores caracteres.

Se puede notar que no existe una parte de la planta exclusiva para diferenciar grupos, aportando para este fin caracteres de todas las partes. Además, este tipo de caracteres no son muy influenciados por el medio ambiente, por lo tanto, el tamaño de muestra mínima es pequeño, lo cual facilita notablemente la toma de datos en campo y ahorra tiempo y dinero. Esto concuerda con las investigaciones de Leakey (1988) en otra leguminosa como frijol, en donde se resalta la importancia de usar descriptores fenotípicos de herencia simple (cualitativos) para la caracterización y futuros trabajos de mejoramiento. En la investigación realizada

por Márquez (1992) en *P. erosus*, se encontró que algunos caracteres cualitativos con mayor valor discriminante son los mismos que en el presente estudio, lo cual indicaría que ciertos caracteres como hábito de crecimiento, forma del lóbulo central del foliolo de la hoja, velocidad de crecimiento del tallo principal y número de días a la floración podrían ser recomendados para utilizarse en una caracterización de todo el género *Pachyrhizus*.

Caracteres cuantitativos

Según Engels (1983a), un carácter para el cual los cuatro grupos tengan valores marcadamente distintos, tendrá un valor D' máximo de 1, por cuanto las cuatro comparaciones posibles serán todas significativas. En el Cuadro 5 se observa los cinco caracteres con mayor valor discriminante observándose que descriptores de la hoja y vaina, si como días a la floración y madurez fisiológica fueron los que permitieron diferencia los cuatro grupo, tal como se refería en el valor promedio. Además, se detectó que las entradas dentro de los grupos mantienen una relación estrecha, es decir, no existe mucha variación ya que presentan valores pequeños de desviación estándar.

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

En todos los casos con excepción del ancho del foliolo principal de la hoja, los valores obtenidos por los grupos se acomodaron de acuerdo al siguiente orden de meno a mayor D' G3, G1, G4 y G2 (Cuadro 5).

Cuadro 5. Caracteres cuantitativos de mayor valor discriminante entre grupos de entradas de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

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

* = Promedio del carácter para el grupo y desviación estándar

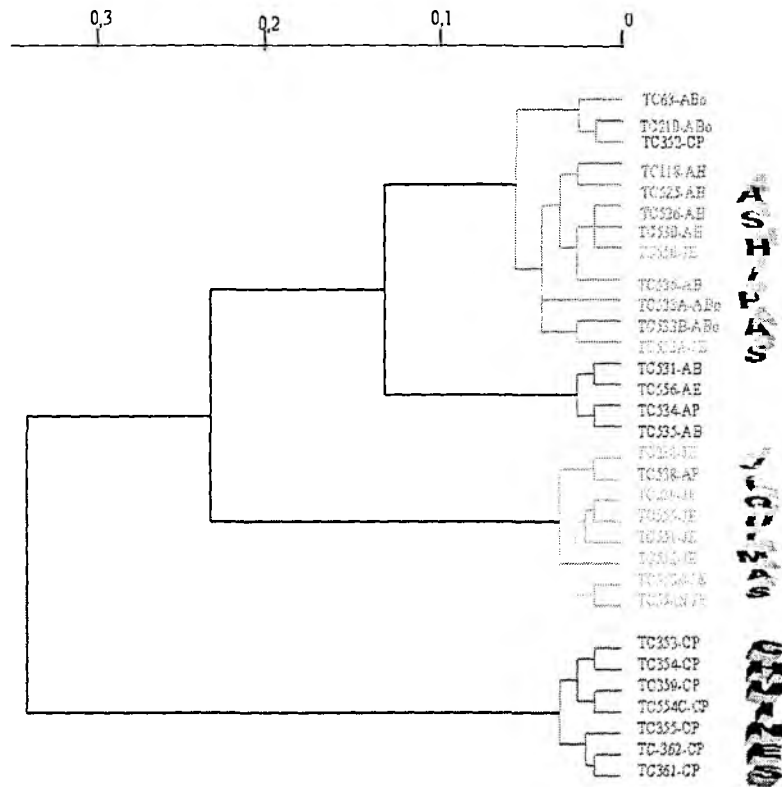
Tanto los caracteres cualitativos como los cuantitativos más discriminantes presentaron otras cualidades interesantes como alta heredabilidad y pequeños

tamaños de muestra, lo cual los convierten en una herramienta potencial para la caracterización morfológica de *P. tuberosus*.

Estructura de los agrupamientos

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

La Fig. 3 representa la ubicación espacial de los individuos de acuerdo a las ecuaciones construidas a partir del coeficiente de Gower (1967) en cada uno de las 31 entradas mediante el análisis discriminante canónico. La variable canónica CAN1 explica el 99% de la variabilidad total y separa el grupo de los chuines y jíquimas de los demás grupos, mientras que la variable canónica CAN2 que explica el 1% de la variabilidad, separa los grupos de las ashipas de los otros dos. Además, se observa que las mayores distancias se presentaron entre los grupos de ashipas con el grupo de chuines (4250 y 3877 respectivamente). Por el contrario, los grupos más relacionados evidentemente fueron los dos grupos de ashipas con una distancia de 394. En el Cuadro 6 se observa los caracteres cualitativos y cuantitativos que son compartidos o no por los subgrupos que se formaron en los cuatros grandes agrupamientos. Se observa que el grupo de los chuines y el G4 comparten y se diferencian en los mismos caracteres.



* entradas que no corresponde su morfología a los datos pasaporte
 — = grupo 1
 — = grupo 4
 — = grupo 3
 — = grupo 2

A = ashipa; C = chuín; J = jíquimaBo =Bolivia; P=Perú; Haití=;B=Brasil; E=Ecuador

Fig.2. Fenograma obtenido por el agrupamiento jerárquico de Ward de la colección de *P. tuberosus* basado en distancias de Gower (1967). CATIE, 199

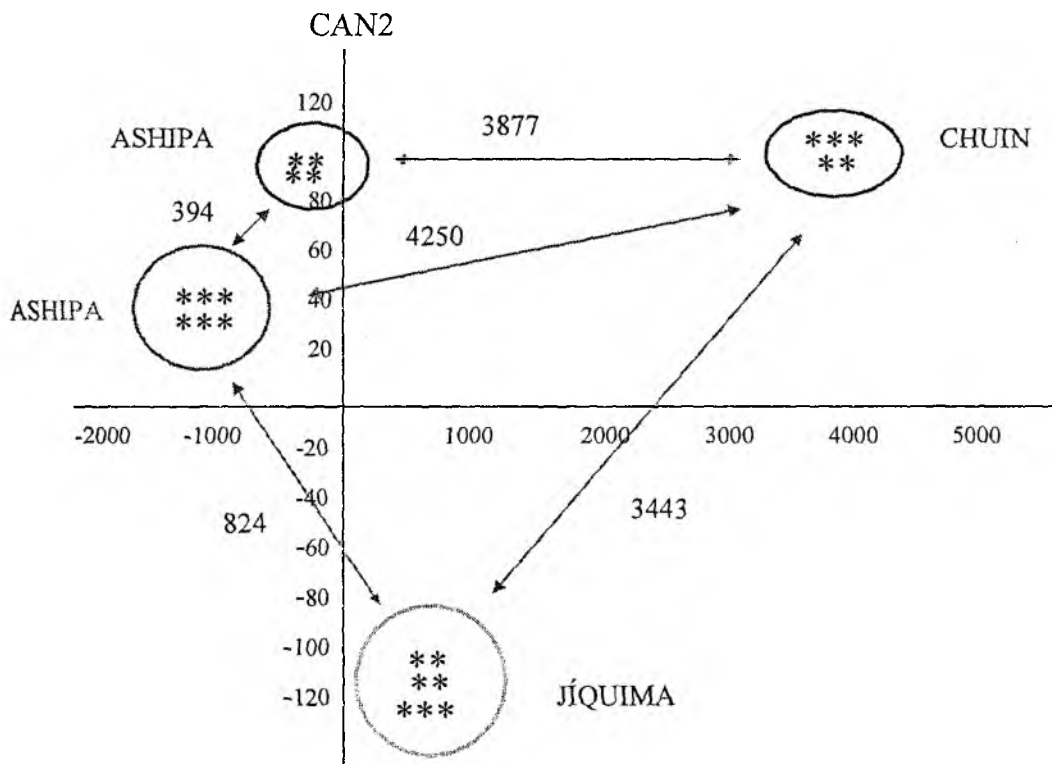


Fig.3. Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CA1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Gower (1967). CATIE, 1998

Cuadro 6. Caracteres cualitativos y cuantitativos similares y diferentes dentro de los cuatro grupos conformados de *P. tuberosus*. CATIE, 1998.

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

Las entradas denominadas ashipas (grupo 1) provienen de Brasil y Bolivia. En 86

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

El agrupamiento 2 contiene entradas originarias exclusivamente de las orilla del río Ucayali en la Amazonía peruana. De igual forma, el agrupamiento 3 se conformó solamente con materiales provenientes de la costa pacífica de Ecuador (Sørensen *et al*, 1997), notándose al igual que en el agrupamiento 1, un genotipo clasificado como ashipa (TC538) dentro de las jíquimas, lo que indica que existió otra mutación de etiqueta o equivocación en la rotulación del genotipo.

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

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

Caracterización Molecular

La caracterización molecular se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Biotecnología, perteneciente al CATIE, Turrialba, Costa Rica. El material vegetal que se usó en la presente investigación fue hojas jóvenes (aproximadamente de cuatro días de producirse su apertura) congeladas a 20°C. La colecta se realizó de una muestra al azar de las 35 repeticiones por entrada. La metodología de extracción fue **CTAB**-minipreparaciones (Harris, 1996) usada en el Laboratorio de Biología Molecular del CATIE. Para la cuantificación del ADN se utilizó geles de agarosa. Para la amplificación se utilizaron 'primers' de las empresas Operon Technology INC. y de University of British Columbia (UBC). La

amplificación se realizó en un Termociclador Perkin Elmer Gene Amp PCR Sistema 9600. Finalmente las muestras fueron sometidas a una electroforesis y luego se realizó la calificación de las bandas polimórficas encontradas en los primers antes mencionadas, asignando un 1 en caso de que la banda estuviera presente y u 0 si estaba ausente. El análisis estadístico se realizó en base al flujograma de la Figura 4.

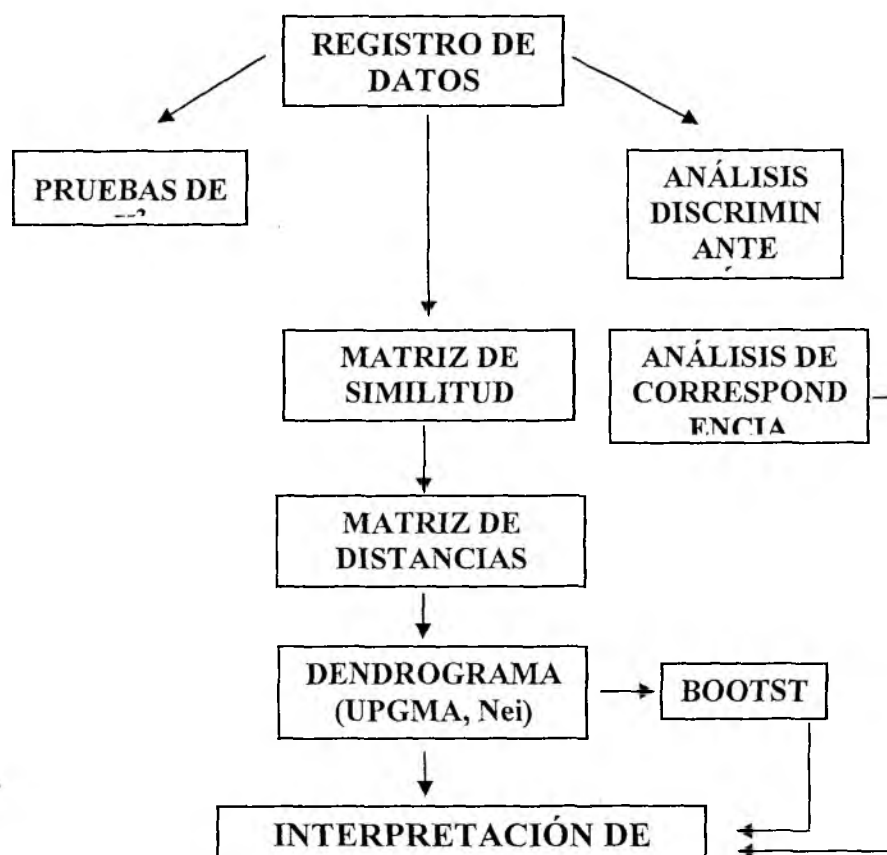


Figura 4. Flujograma del análisis de los datos moleculares generados mediante la metodología RAPDs en la colección de *P. tuberosus* del CATIE, 1998

Aislamiento y determinación de la concentración de ADN

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

La intensidad en la maceración influye notablemente en la cantidad de ADN extraído, por lo tanto, una pulverización total de la muestra con nitrógeno líquido en un mortero produce los mejores resultados obteniéndose cantidades adecuadas de ADN. Las muestras extraídas de las 31 entradas presentaron contaminación de ARN y carbohidratos los cuales no fueron eliminados por alguna técnica de purificación ya que se observó que dicha contaminación no influye en la amplificación de ADN.

En el Cuadro 7, se observa los promedios, valores mínimos y máximos, desviación estandar y coeficiente de variación (CV) para la variable rendimiento de ADN extraído de 31 entradas de *P. tuberosus*, con dos repeticiones. Se observaron cantidades de ADN entre 20 y 100 µg/ml con un promedio para la colección de 79,6 µg/ml. Las pruebas de Duncan detectan diferencias altamente significativas observándose que las entradas TC533A (ashipa) y TC553B (jiquima) presentan los valores más altos con 100 µg/ml; y la entrada TC530 (ashipa) el menos valor con 20 µg/ml. Esto indica que el rendimiento de ADN depende exclusivamente del genotipo ya que los mayores como menores valores lo obtuvieron dos entradas de ashipas. Esto demuestra que no existen diferencias en el rendimiento de ADN entre los tres grupos (chuines, ashipas y jiquimas) previamente clasificados etnobotánicamente por Sørensen (1996). La mayor parte de las entradas estuvieron cerca del promedio con un rango entre 60 y 80 µg/ml.

Cuadro 7. Estadísticas descriptivas para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de *P. tuberosus* CATIE, 1998.

Número de individuos	Valor mínimo (ng)	Valor máximo (ng)	Media (ng)	Desviación estándar (ng)	CV %
62	20,0	100,00	79,68	17,24	21,64

A su vez, el análisis estadístico (Cuadro 8) detecta diferencias altamente significativas entre las entradas ratificando que el rendimiento de ADN depende de la estructura genética individual del material.

Cuadro 8. Análisis estadístico para la variable rendimiento de ADN de 31 entradas de *P. tuberosus* CATIE 1998

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

** = altamente significativo

La cantidad extraída de ADN está relacionada a la naturaleza del material ya que al repetir la extracción de un día a otro, se pudo notar que no aumenta la cantidad de ADN. El método utilizada (CTAB modificado) permitió extraer ADN de buena calidad y cantidad suficiente para el trabajo de RAPDs. Además, los costos fueron relativamente bajos por muestra con un valor de 1,02 dólares.

Amplificación del ADN (RAPDs)

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

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

Se realizó pruebas para encontrar la concentración óptima de cada uno de los primers, que consistieron en evaluar inicialmente tres concentraciones por primer (0,3; 0,7 y 1µM). Luego se trató de ajustar para cada primer la concentración que producía la mejor visualización de bandas. En el Cuadro 9 se detalla las concentraciones óptimas que produjeron amplificación en la colección, notándose en las series A, B y H de Operón que no se produjo amplificación en un 25% y las mejores concentraciones de amplificación estuvieron entre un rango de 0,3 a 1,2 µM. En los primers UBC se produjo amplificación en un 23%, es decir, el 77% de los primers utilizados no amplificaron. Además, a diferencia de los Operón las óptimas concentraciones fueron mas bajas con un rango de 0,2 a 0,8 µM.

Cuadro 9. Concentraciones de primers evaluados en la colección de *P. tuberosus* del banco de germoplasma del CATIE, 1998

Primer	Concen. (µm)	Primer	Concen. (µm)	Primer	Concen. (µm)
OPA1	0,4	OPB11	1,2	UBC1	n.a.
OPA2	0,5	OPB12	1	UBC2	n.a.
OPA3	0,4	OPB13	1,2	UBC3	n.a.
OPA4	1	OPB14	n.a.	UBC4	n.a.
OPA5	0,5	OPB15	1	UBC5	n.a.
OPA6	1	OPB16	n.a.	UBC6	n.a.
OPA7	1	OPB17	0,7	UBC7	n.a.
OPA8	1	OPB18	0,7	UBC8	n.a.
OPA9	0,4	OPB19	n.a.	UBC9	n.a.
OPA10	0,4	OPB20	n.a.	UBC10	n.a.
OPA11	0,3	OPH1	n.a.	UBC35	n.a.
OPA12	n.a.	OPH2	n.a.	UBC36	n.a.
OPA13	0,3	OPH3	0,7	UBC37	n.a.
OPA14	1	OPH4	1	UBC38	n.a.
OPA15	n.a.	OPH5	1	UBC39	n.a.

Cuadro 9 Continuación

Primer	Concen. (μ m)	Primer	Concen. (μ m)	Primer	Concen. (μ m)
OPA16	0,5	OPH6	1	UBC70	n.a.
OPA17	0,7	OPH7	1	UBC71	n.a.
OPA18	0,6	OPH8	0,7	UBC72	0,2
OPA19	0,3	OPH9	0,7	UBC73	n.a.
OPA20	0,3	OPH10	n.a.	UBC74	n.a.
OPB1	1,2	OPH11	0,7	UBC101	0,2
OPB2	1,2	OPH12	0,7	UBC102	0,2
OPB3	1,2	OPH13	0,7	UBC103	0,2
OPB4	1	OPH14	n.a.	UBC104	0,2
OPB5	1,2	OPH15	0,7	UBC105	0,2
OPB6	n.a.	OPH16	n.a.	UBC535	0,8
OPB7	0,9	OPH17	0,7		
OPB8	n.a.	OPH18	1		
OPB9	n.a.	OPH19	n.a.		
OPB10	1,2	OPH20	0,7		

n.a. = no hubo amplificación

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

Descripción del polimorfismo revelado

Las concentraciones para los primers polimórficos variaron entre 0,2 y 1 μ M, según se indica en el Cuadro 9. Para todos los primers la proporción de G-C fue mayor o igual a 60% (Williams *et al.*, 1990), tomando en cuenta que existe una mayor proporción de base A-T en las cadenas de ADN que requieren de las bases complementarias respectivas al ser amplificadas (Cuadro 10). La selección de los primers polimórficos se basó en las pruebas realizadas con los 85 primers listados en el Cuadro 9, encontrándose 10 primers polimórficos, 7 de la empresa Operón y 3 de la Universidad de British Columbia (Cuadro 10).

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

Cuadro 10. Primers' polimórficos utilizados para la caracterización molecular de la colección de *P. tuberosus* del banco de germoplasma del CATIE, 1998.

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

Caracterización de la colección de *P. tuberosus*

Los RAPDs generados (32 bandas polimórficas) fueron usadas para determinar las relaciones entre las 31 entradas de *P. tuberosus*. Como lo indica el flujograma de la Fig. 6, el análisis "cluster" produjo un dendrograma UPGMA y un consenso "bootstrap" (Fig. 6) analizados con el paquete estadístico Popgene y Winboot respectivamente y basados en la matriz de distancia de Nei (1979).

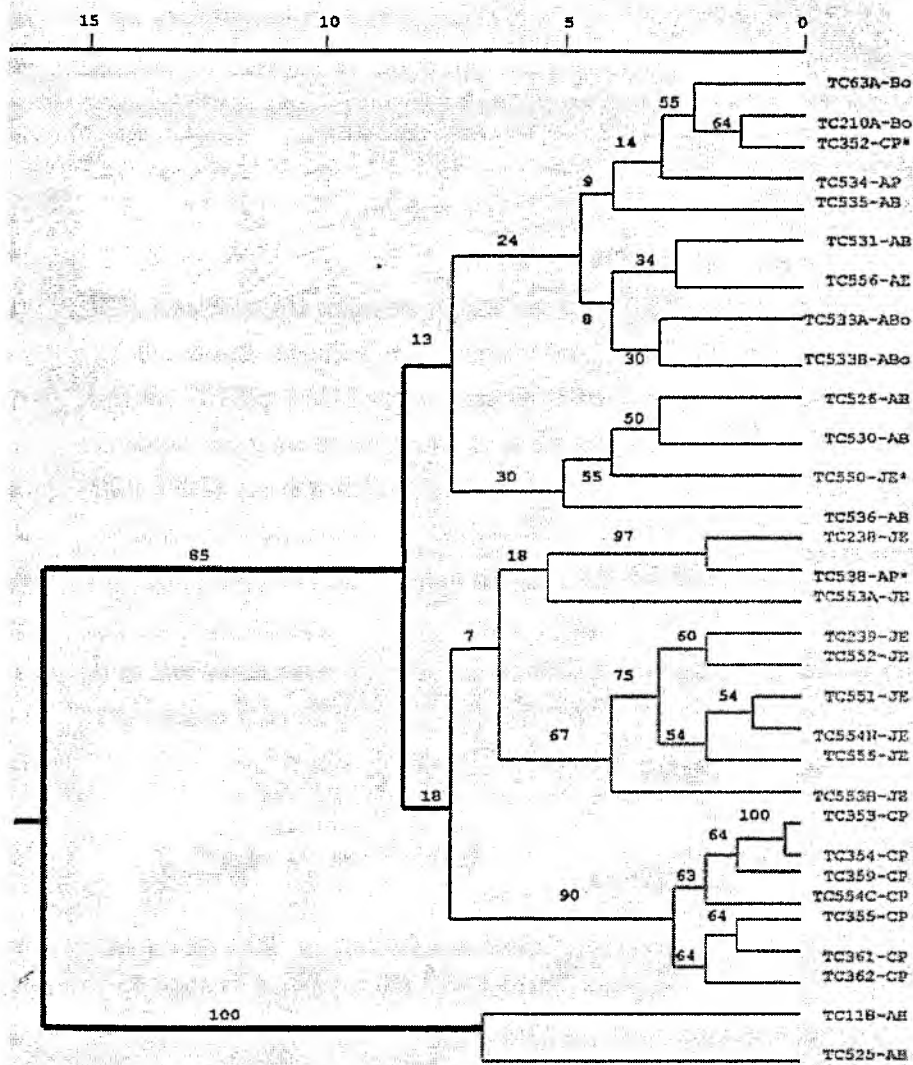
Matriz de distancias y dendrograma

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

Dentro de cada grupo se puede observar subgrupos cuyas distancias son relativamente pequeñas entre ellos, es así que en el grupo de las ashipas se distinguen tres subgrupos, en cambios en los chuines y jíquimas se observan dos subgrupos (Fig. 6).

Por otro lado, en el dendrograma se observa el grupo de los chuines distribuido geográficamente únicamente en Perú (P), las jíquimas solamente en Ecuador (E) y las ashipas tiene una más amplia distribución encontrándose en Ecuador, Perú, Bolivia (Bo) y Brasil (B) (Fig. 6).

Dentro de la colección de *P. tuberosus* se observó una interesante diversidad genética geográfica, ratificando el endemismo de las entradas pertenecientes a los chuines y las jíquimas que presentan pequeñas variaciones en su patrón genético, lo cual puede ser el resultado de una única introducción en las zonas de la Amazonía peruana y en la costa pacífica ecuatoriana respectivamente, desde las comunidades vecinas (Sørensen *et al.* 1997). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la caracterización morfológica realizada en este estudio. El grupo de las ashipas indiscutiblemente se muestra como el más diverso geográficamente con materiales cultivados de Ecuador, Perú, Brasil y Bolivia, llevando a pensar que pudo haber un flujo de germoplasma a lo largo de los ríos que conforman la Amazonía y el intercambio de germoplasma en los últimos años entre colectores, bancos de semillas y comunidades indígenas (Sørensen, comun. personal).



* entradas que no corresponden su genotipo a los datos pasaporte

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

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

Fig. 6. UPGMA dendrograma y 'Bootstrap' (2000 replicaciones) de la colección de *P. tuberosus* basado en distancias genéticas de Nei (1979). CATIE, 1998.

Bootstrap

Felsenstein (1985), manifiesta que solamente grupo con valore de bootstrap de 95% o más grande puede ser considerado significativo. Siguiendo esta regla, solamente el grupo constituido por las entradas TC525 y TC118 con un valor de 100% es un grupo fuerte o bien conformado. Además, dentro del grupo de las jíquimas, se observa un subgrupo constituido por las entradas TC538 y TC354 con un valor de 100%. Aunque el brazo que forma los tres grupos es relativamente bajo en su valor bootstrap con 85%, se le puede considerar como un brazo fuerte para separar los tres grupos (ashipas, chuines y jíquimas). Al igual el brazo del grupo de los chuines es bien conformado con un valor de 90% y es distintivo de los otros grupos. Los brazos que agrupan a las ashipas y jíquimas son muy débiles con valores muy bajos (Fig. 6).

Pruebas de X^2

Por medio de una prueba X^2 se procedió a reconocer la importancia o el aporte de cada uno de las 32 bandas polimórficas, distinguiéndose 25 de ellas con efecto significativo, por lo tanto, los marcadores OPA3-2, OPA13-3, OPH5-1, OPH8-1, UBC72-4, UBC72-5 y UBC101-3 fueron los que no tuvieron un aporte significativo en la formación de los grupos. Las frecuencias de ausencia o presencia indican un predominio de alelos con 8, es decir, con ausencia de la banda (Cuadro 11).

Cuadro 11. Pruebas X^2 para los RAPDs polimórficos y sus frecuencias de presencia y ausencia, con el coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998.

Marcador	Frecuencias		X^2	Probabilidad
	0 ^(a) (%)	1 ^(b) (%)		
OPA03-1	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPA03-2	98,3	1,7	1,3	0,734 ^{ns}
OPA05-1	74,9	25,1	13,9	0,003**
OPA08-1	28,5	71,5	17,1	0,001**
OPA08-2	65,1	34,9	21,3	0,001**
OPA13-1	32,5	67,5	17,0	0,001**
OPA13-2	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPA13-3	85,4	14,6	3,1	0,376 ^{ns}
OPH5-1	72,8	27,2	2,8	0,426 ^{ns}
OPH5-2	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPH08-1	98,3	1,7	0,7	0,868 ^{ns}
OPH08-2	6,4	93,6	31,0	0,001**
OPH08-3	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH08-4	77,4	22,6	31,0	0,001**
OPH08-5	26,0	74,0	15,1	0,001**
OPH08-6	93,5	6,5	31,0	0,001**
OPH15-1	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH15-2	27,4	72,6	28,5	0,001**
OPH15-3	98,1	1,9	8,6	0,034*
OPH15-4	6,4	93,6	31,0	0,001**
UBC72-1	6,4	93,6	31,0	0,001**

Cuadro 11 Continuación

Marcador	Frecuencias		X ²	Probabilidad
	0 ^(a) (%)	1 ^(b) (%)		
UBC72-2	22,6		31,0	0,001**
UBC72-3	93,5	77,4	31,0	0,001**
UBC72-4	98,3	6,5	0,7	0,868 ^{ns}
UBC72-5	98,3	1,7	0,7	0,868 ^{ns}
UBC72-6	90,3	1,7	8,1	0,043*
UBC101-1	23,7	9,7	23,5	0,001**
UBC101-2	98,1	76,3	8,6	0,034*
UBC101-3	96,6	1,9	2,7	0,441 ^{ns}
UBC101-4	20,1	3,4	10,8	0,012
UBC101-5	98,1	79,9	8,6	0,034*
UBC535-1	77,3	1,9	14,1	0,002**
		22,7		

^(a) 0 = ausencia ^(b) 1 = presencia

Ns = no significativo

* = significativo al 5%

** = significativo al 1%

Análisis discriminante canónico y análisis de correspondencia

Los resultados del análisis de X² son ratificados al realizar el análisis canónico discriminante, coincidiendo en los valores de significancia para las bandas polimórficas. El resultado de este análisis indica que la variable canónica CAN1 explica un 90% de la variación total, por lo tanto, el valor restante del 10% es explicado por la CAN2.

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

La Fig. 7 representa la ubicación espacial de los individuos de acuerdo a las ecuaciones construidas a partir de los coeficientes canónicos brutos, calculados con los valores individuales para cada marcador en cada uno de los 31 individuos. Se aprecia al igual que en el dendrograma de la Fig. 6, cuatro grupos bien constituidos de jíquimas, chuines, ashipas y los probables híbridos. La CAN1 separa el grupo 4 de los posibles híbridos de ashipa con los demás grupos. Mientras que la CAN2 separa el grupo 1, 2, y 3 que contienen a las ashipas, chuines y jíquimas. Además en la Fig. 6 se aprecia que las distancias que separan los grupos son entre 1 y 2 de 0,17; 1 y 3 de 0,14; entre 2 y 3 de 0,16; lo que indica similitud entre estos tres grupos, en cambio, las distancias con el grupo 4 son alrededor de 0,54 a 0,56. Es así, que el análisis de correspondencia ratifica los resultados obtenidos en el análisis discriminante ubicándose los grupos de chuines, ashipas y jíquimas a distancias muy cortas, en cambio, los híbridos muy separados de los demás grupos (Fig. 7).

La técnica RAPD contribuyó en la investigación a una mejor caracterización de la colección y a la detección de posibles duplicados. Se detectó errores de etiquetado en las entradas TC550, 5C352 y TC538, lo cual es reforzado con los resultados morfológicos. Además, la entrada TC553A que se había agrupado como una ashipa en el fenograma morfológico, en la caracterización molecular se agrupó como una jíquima, lo cual permite por medio de esta técnica asignar la correcta ubicación de este material. Otra de las ventajas de los marcadores moleculares que contribuyeron en el presente estudio fue como se dijo anteriormente la posible identificación de dos materiales (TC118 y TC525) como posibles híbridos entre *P. tuberosus* y *P. erosus* producto de ciertas multiplicaciones realizadas en conjunto de materiales de las dos especies ((Sørensen, comun. personal). Además, se logró por medio de esta técnica la verdadera reubicación de ciertos materiales que en la evaluación morfológica se habían ubicado como un cuarto grupo y que verdaderamente están inmersos dentro del grupo 1 de las ashipas.

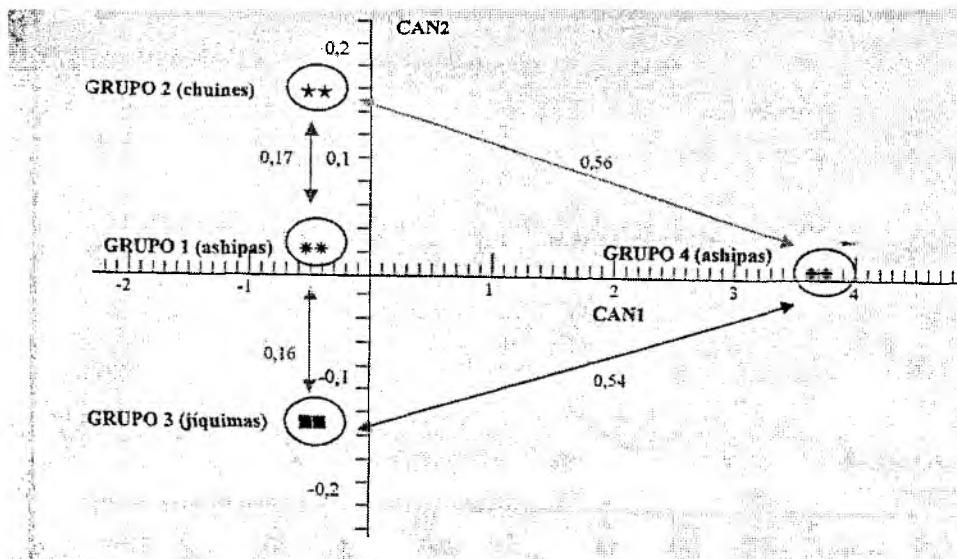


Figura 7 Distribución de los individuos o entradas en función de las variables canónicas CAN1 y CAN2, procedentes del análisis de resultados del coeficiente de Nei (1979). CATIE, 1998.

Relación entre los marcadores morfológicos y moleculares

En el flujograma de la Figura 8 se detalla el tipo de análisis estadístico utilizado para relacionar las matrices de distancia de la caracterización morfológica y molecular.

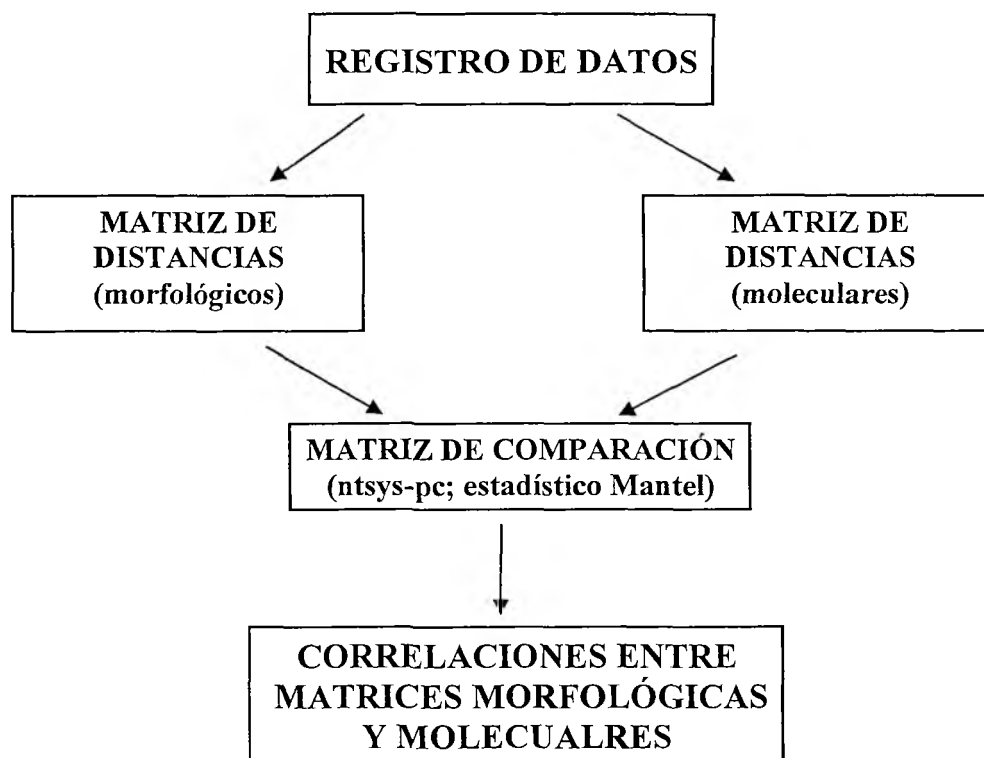


Figura 8 Flujograma del análisis de relación entre los datos morfológicos y moleculares de la colección de *P. tuberosus*. CATIE, 1998

Se utilizó para la comparación entre los caracteres morfológicos y moleculares, las matrices de distancias de Gower (1967) y Nei (1979), respectivamente. Mediante el programa MXCOMP del software ntsys-pc se analizó la correlación de las dos matrices y se identificó la significancia mediante el valor t de Mantel (1967) que fue comparado con el valor de la probabilidad para Z derivado de 2000 permutaciones al azar. En el Cuadro 12 se observa que las 16 diferentes combinaciones de marcadores morfológicos relacionados con los 32 y 25 polimorfismos, dieron en todos los casos, valores significativos o altamente significativos, a excepción de los caracteres cuantitativos cuando fueron analizados separadamente, es decir, por un lado los siete más discriminantes y por el otro, el resto de estos caracteres (33).

Además se detectó que los caracteres cualitativos relacionados con las matrices

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

Al comparar los resultados de correlación obtenidos cuando se utilizó los 32 y 25 polimorfismos se identificó que los valores disminuyen cuando se excluyen polimorfismos, es así, que la correlación con 32 bandas fue de 0,40 y con 25 de 0,29. Este mismo comportamiento se observó en las demás combinaciones, inclusive se detectó que los caracteres cuantitativos más discriminantes no tiene ninguna relación con las 25 bandas polimórficas (Cuadro 12).

Cuadro 12. Relación de las matrices de distancias entre diferentes caracteres morfológicos y marcadores moleculares. CATIE, 1988.

Marcador morfológico	Marcador molecular	R*	Marcador molecular	r*
Todos los 70 caracteres	32 bandas	0.40**	25 bandas	0.29**
Todos los caracteres cualitativos (30)	32 bandas	0.43**	25 bandas	0.33**
Todos los caracteres cuantitativos (40)	32 bandas	0.29**	25 bandas	0.19**
Caracteres cualitativos y cuantitativos con mayor valor discriminante (17)	32 bandas	0.30**	25 bandas	0.14**
Caracteres cualitativos con mayor valor discriminante (10)	32 bandas	0.41**	25 bandas	0.26**
Caracteres cuantitativos con mayor valor discriminante (7)	32 bandas	0.15 ^{ns}	25 bandas	0.00 ^{ns}
Resto de caracteres cualitativos (20)	32 bandas	0.47**	25 bandas	0.42**
Resto de caracteres cuantitativos (33)	32 bandas	0.15 ^{ns}	25 bandas	0.00 ^{ns}

* = Correlación entre las matrices de distancias

Este mecanismo ayuda a corroborar que los resultados obtenidos en la caracterización morfológica y molecular fueron muy coherentes y similares como se puede verificar en los grupos que se formaron y que son bien expresados mediante los fenogramas, dendrogramas y la graficación del análisis discriminante canónico. En otras investigaciones realizadas en la década de los 80 y 90 como la que Autrique *et al* (1996) no obtuvieron diferencias significativas en avena entre marcadores RFLP y características morfológicas; y, por el contrario, Schut *et al* (1997) trabajando en cebada, encontraron relaciones bajas entre los marcadores AFLP y los caracteres morfológicos.

En torno a lo anterior se suscita la pregunta que si existe una correlación significativa entre los dos grupos de datos, entonces, sería conveniente realizar la

caracterización de una de las dos formas, molecular y morfológica?. Esta interrogante ayuda nuevamente a confirmar el aporte de los caracteres moleculares en la evaluación de germoplasma e indica también que ciertos caracteres morfológicos juegan un papel fundamental para la caracterización de germoplasma y el mejoramiento del cultivo, principalmente aquellos menos influenciados por el medioambiente y efectos epistáticos, como son los caracteres cualitativos.

Bibliografía

- Autrique, E.; Nachit, M.; Monneveux, P.; Tanksley, S.; Sorrells, M. 1996. Genetic diversity in durum wheat based on RFLPs, morphological traits and coefficient of parentage. *Crop Science* 36:735-742
- Dragon, E. 1993. Handling reagents in the PCR laboratory. *Suplemento de Cold Spring Harbor Laboratory, PCR Methods and Applications* 3:58-59
- Duke, J.A. 1981. *Handbook of legumes of world economic importance*. New York and London, Plenum. pp.182-185
- Duncan, D. 1975. T-Tests and intervals for comparisons suggested by the data. *Biometric* 31:339-359
- Engels, J.M.M. 1983a. A systematic description of cacao clones. 1. The discriminative value of quantitative characteristics. *Euphytica (Holanda)* 32:377-396
- Enriquez, G. 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. Ma. Sci. Turrialba, Costa Rica. IICA. 97 p.
- Gower, J. 1967. A comparison of some methods of clusters analysis. *Biometrics* 23:623-637
- Harris, S.A. 1996. *Molecular analysis of forest tree biodiversity—a selection of practical protocols*. Oxford, England. 47 p.
- IPGRI. 1995. *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. Report of IPGRI Workshop, Roma Italy, 9-11 october. Eds. W. Ayad, t. Hodgkin; A. Janadat; V. Rao. 137 p.
- Karp, A.; Skresovich; Bhat, K.; Ayad, W.; Hodgkin, T. 1997. *Molecular tools in plant genetic resources conservation—a guide to the technologies*. IPGRI Technical Bulletin, No. 2. 47 p.
- Kendall, M.; Stuart, A. 1979. *The advanced theory of statistics*. Volumen 2. New York Macmillan Publishing Company, Inc. s.p.
- Kwok, S; Higuchi, R. 1989. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 339:237-238
- Leakey, C.L. 1988. Genotypic and phenotypic markers in common bean. Genetic resources of *Phaseolus* beans. In: Paul Gets Ed. Dordrecht, Holland, Kluwer Academia Publishers. p. 245-327
- Marquez, J.M. 1992. Caracterización sistemática, parámetros genéticos e índices de selección de la colección de jícama (*Pachyrhizus erosus* L. Urban) del CATIE. Tesis Mag.Sc., Turrialba, Costa Rica. CATIE. 142 p.
- Morera, J. 1981. Descripción sistemática de la colección de Panamá de pejibaye (*Bactris gasipaes* H.B.K.) del CATIE. Tesis M. SC. CATIE, Turrialba, Costa

- Rica. 122 p.
- Morera, J. 1992. Rejuvenecimiento, caracterización, evaluación y utilización de jícama en CATIE-Costa Rica. *Internacional Symposium on Tuber Legumes*, 10, Guadeloupe, Proceedings. Resumen en Inglés. Sørensen, M., ed. 1993. Scientific Report of the Yam Bean Project. Copenhagen, Denmark. pp.189-206
- National Academy Of Sciences. 1979. Root Crops. Yam Bean. *In Tropical Legumes. Resources for the future*. Washington, USA. pp.21-27
- Nei, M.; Li, W. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 76:269-5273
- Peckolt, G. 1922. Jacutupé. *Chácaras & Quintais* 25, 187-9 and 25, 275-6.
- Pound, J.F. 1932. The genetic constitution of the cacao crop. *In Imperial College of Tropical Agriculture, Trinidad. Annual Report on Cacao Research* 2:2729
- Schut, J.; Qi, X.; Stam, P. 1997. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley. *Theor. Appl. Genet* 95:161-1168
- Steel, G.; Torrie, J. 1980. Principles and procederus of statistics. A biometrics approach. McGraw-Hill, New York. s.p.
- Sørensen, M. 1988. A taxonomic revision of the genus *Pachyrhizus* (Fabaceae-Phaseoleae). *Nordic Journal of Botany* 8(2):167-192
- 1990. Observaciones on distribution, ecology and cultivation of the tuber-bearing legume genus *Pachyrhizus* Rich. ex DC. *Wageningen Agricultural University Papers (Netherlands)* 90(3):38
- 1996. Yam bean, *Pachyrhizus* DC. IPGRI, Roma, Italia. 141 p.
- ; DØGAARD, S.; ESTRELLA, J.; KVIST, L.; NIELSEN, P. 1997. Status of the South American tuberous legume *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. *Biodiversity and Conservation* 6:581-1625
- Vietmeyer, N.D. 1986. Lesser-known plants of potencial use in agricultura and forestry. *Science (USA)* 232:1379-1384
- Ward, Jr. J.H. 1963. Hierarchical grouping to optimize an objective function. *Journal of the American Statistical Association (EEUU)* 58:236-244
- Williams, J.; Kubelik, K.; Livak, K.; Rafalski, J.; Tingey, S. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids. Res.* 18:6231-6235.