

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA
LA MOLINA**

FACULTAD DE CIENCIAS



**“Caracterización citogenética y molecular de las especies
cultivadas del género *Pachyrhizus* Richard ex DC”**

Presentado por:

Mónica Lucía Santayana Rivera

Tesis para Optar el Título Profesional de:

BIÓLOGO

**LIMA-PERÚ
2012**

ÍNDICE GENERAL

Índice de cuadros	iii
Índice de figuras	iv
Índice de anexos	v
Resumen	vi
Abstract	vii
I. Introducción	1
II. Revisión de literatura	3
2.1 El género y las especies	3
2.1.1 <i>Pachyrhizus erosus</i> (L.) Urban	4
2.1.2 <i>Pachyrhizus ahipa</i> (Wedd.) Parodi	4
2.1.3 <i>Pachyrhizus tuberosus</i> (Lam.) Sprengel	6
2.2 Caracterización de recursos fitogenéticos	10
2.3 Caracterización citogenética	11
2.4 Caracterización molecular mediante marcadores AFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados)	12
2.5 Análisis filogenético	14
2.6 Índices de diversidad	15
III. Materiales y métodos	17
3.1 Obtención del material vegetal	17
3.2 Determinación de ploidía en células meristemáticas de raíces en <i>Pachyrhizus</i>	19
3.3 Extracción de ADN	20
3.4 Preparación de muestras para AFLP	20
3.4.1 Iniciadores AFLP	21
3.4.2 Amplificación preselectiva	22
3.4.3 Amplificación selectiva	23
3.4.4 Análisis de datos	23
IV. Resultados y discusión	25
4.1 Conteo de cromosomas	25
4.2 Caracterización molecular mediante marcadores AFLP	30
4.2.1 Tamizado de iniciadores	30
4.2.2 Polimorfismo y diversidad fenotípica	31

4.2.3	Análisis genético	32
4.2.4	Análisis de coordenadas principales (PCoA)	35
4.2.5	Análisis de varianza molecular (AMOVA)	38
V.	Conclusiones	46
VI.	Recomendaciones	48
VII.	Referencias bibliográficas	49
VIII.	Anexos	58

ÍNDICE DE CUADROS

1. Accesiones de <i>Pachyrhizus</i> pertenecientes al banco de germoplasma del CIP utilizadas en los estudios citogenético y molecular.	18
2. Secuencias de los iniciadores EcoRI y MseI. Los iniciadores E00 y M00 no poseen nucleótidos selectivos por lo tanto se muestran las secuencias núcleo.	22
3. Ploidía y número cromosómico para 39 accesiones de <i>Pachyrhizus</i> .	27
4. Combinaciones de iniciadores AFLP elegidas para el análisis de diversidad y agrupamiento de las accesiones de <i>Pachyrhizus</i> .	30
5. Número de fragmentos AFLP por combinación de iniciadores, índices de diversidad fenotípica de Shannon (<i>Hs</i>) y comparación entre las tres especies cultivadas de <i>Pachyrhizus</i> .	31
6. Resultados del AMOVA para las tres especies de <i>Pachyrhizus</i>	38
7. Resultados del AMOVA para los individuos de <i>P. tuberosus</i>	39
8. Resultados del AMOVA para los individuos de <i>P. tuberosus</i> sin la accesión CIP 209056	39

ÍNDICE DE FIGURAS

1. Características morfológicas de *P. erosus*. a) Hoja, semillas, legumbre y raíz. 5
b) Porte herbáceo
2. Características morfológicas de *P. ahipa*. a) Porte herbáceo con frutos 6
b) Flor e inflorescencia. c) Semillas.
3. Características morfológicas de *P. tuberosus*, cultivar Chuin. Se observan 8
dos fenotipos (a y b) correspondientes a la misma accesión.
4. Característica morfológicas de *P. tuberosus*, cultivar Ashipa 8
5. Porcentaje de células en metafase para las accesiones de *Pachyrhizus* con 26
las que se realizaron las pruebas preliminares.
6. Microfotografías de células en metafase mostrando 22 cromosomas 28
condensados para: a) *P. ahipa* (CIP 209004), b) *P. tuberosus* (CIP 209014),
c) *P. erosus* (CIP 209019) y d) Híbrido: *P. ahipa* x *P. tuberosus*
(CIP 209045). Grado de aumento: 100x
7. Dendrograma generado por agrupamiento no ponderado por pares utilizando 34
la media aritmética (UPGMA).
8. Patrón AFLP de dos combinaciones elegidas de iniciadores mostrando 35
al individuo CIP 209057 (b) flanqueado por dos individuos *P. tuberosus*
(a y c) y comparado con tres individuos de *P. erosus* (d, e y f). M: marcador
de peso.
9. Análisis de coordenadas principales de las especies de *Pachyrhizus* incluyendo 37
híbrido *P. ahipa* x *P. tuberosus*. *P. erosus* (rojo), *P. ahipa* (azul), *P. tuberosus*
(verde) e Híbridos (negro).

INDICE DE ANEXOS

1. Porcentajes de fragmentos polimórficos para cada par de iniciadores evaluados en el tamizado.	59
2. Sección de gel mostrando los fragmentos generados por los iniciadores: 1. E45/M59, 2. E46/M42, 3. E46/M48 y 4. E46/M54.	60
3. Análisis de coordenadas principales para la especie <i>P. ahipa</i> .	61
4. Análisis de coordenadas principales para la especie <i>P. tuberosus</i> .	62
5. Análisis de coordenadas principales para la especie <i>P. erosus</i> .	63
6. Protocolo para extracción de DNA (pequeña escala)	64
7. Protocolo para desarrollar polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados (AFLPs)	65
8. Protocolo para electroforesis en gel de poliacrilamida	66
9. Tinción del gel con nitrato de plata	67
10. Preparación de buffers para extracción de DNA	68
11. Preparación de Buffers y mezclas de reacción para AFLP	69
12. Preparación de soluciones tampón para electroforesis en gel de acrilamida	72

RESUMEN

Se determinó el nivel de ploidía y se realizó un estudio con marcadores moleculares AFLP de tres especies cultivadas del género *Pachyrhizus* y de sus híbridos interespecíficos. Todas las accesiones evaluadas fueron diploides ($2n=2x=22$) coincidiendo con la estabilidad reportada en número básico para el género Phaseoleae. Esto indica que el proceso evolutivo no se habría dado por cambios en el número cromosómico a causa de anomalías en el ciclo celular sino por eventuales polimorfismos en el ADN. El estudio de una muestra de 42 accesiones mediante ocho combinaciones de marcadores AFLP identificó 266 fragmentos en total, de los cuales 181 fueron polimórficos (68 por ciento). Los índices de diversidad de Shannon (H_s) fueron 1.43 para *P. ahipa*, 1.31 para *P. tuberosus* y 2.49 para *P. erosus*, la diversidad total en promedio fue de 2.85. El análisis genético y de coordenadas principales discriminaron claramente a las tres especies, de la misma manera que mediante AMOVA se comprobó que la variación total está explicada por el 72.26 por ciento de la variación molecular que existe entre las tres especies. Un AMOVA realizado para los cultivares Chuin y Ashipa dentro de *P. tuberosus* indicó que la variación total es explicada por la variación molecular entre cultivares, que fue de 75.10 por ciento. Finalmente se pudo identificar duplicados en la especie *P. ahipa* y una accesión mal clasificada en *P. tuberosus* esta información es importante para el manejo eficiente de una colección en un banco de germoplasma.

Palabras clave:

Pachyrhizus, caracterización, ploidía, AFLP.

ABSTRACT

The ploidy level and AFLP molecular analysis of three cultivated species of *Pachyrhizus* and their interspecific hybrids were determined. All the accessions evaluated were diploids ($2n = 2x = 22$), confirming the stability reported in chromosome basic number for the tribe Phaseoleae. This would indicate that the evolutionary process would not have occurred by changes in chromosome number due to abnormalities in the cell cycle but for eventual polymorphisms in the DNA. A molecular analysis of a sample of 42 accessions was done by AFLP technique. Eight AFLP primer pairs detected a total of 266 fragments from which 181 were polymorphic (68 per cent). Shannon diversity indexes (H_s) for the three species were 1.43 for *P.ahipa*, 1.31 for *P. tuberosus*, 2.49 for *P.erosus* and for total mean diversity was 2.85. Genetic and principal coordinates analyses clearly discriminate the three species. AMOVA results also differentiate the species founding that total variation is explained in 72.26 per cent by molecular variation that exists among all three species. An AMOVA performed for the cultivars Ashipa and Chuin within *P. tuberosus* indicated that the total variation is explained in 75.10 per cent by the molecular variation among cultivars. Finally it was possible to identify duplicates in *P. ahipa* and a misclassified accession in *P. tuberosus*, this information is useful for the efficient management of a collection in a genebank.

Key words:

Pachyrhizus, characterization, ploidy, AFLP

I. INTRODUCCIÓN

El género *Pachyrhizus* Rich. ex DC. pertenece a la familia Fabaceae, tribu Phaseoleae, subtribu Glycininae, engloba cinco especies de las cuales tres son cultivables, *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban, *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi y *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Sprengel. La primera, *P. erosus*, es originaria de México y es la más popular tanto en Centro América como en África y Asia. Mientras que *P. ahipa* y *P. tuberosus* son especies sudamericanas consideradas dentro del rubro de raíces y tubérculos andinos (RTAs) que están siendo estudiadas recientemente debido al potencial que albergan como cultivos alternativos (CIP, 1998).

El banco de germoplasma del Centro Internacional de la Papa (CIP) mantiene accesiones de las tres especies cultivadas de *Pachyrhizus* spp. y actualmente realiza colectas con el fin de ampliar la colección. Una vez adquirido el nuevo material los primeros estudios a realizar son de caracterización. Este tipo de estudios sobre los recursos fitogenéticos en general son importantes porque documentan la diversidad presente en la colección y que tan diferentes son unas accesiones de otras para evitar tener duplicados. Esta información es importante para la formación de colecciones núcleo que son un sub-grupo de la colección original que alberga la mayor diversidad posible, sino toda, con el menor número de accesiones y de esta manera establecer prioridades sobre el gasto de recursos para mantener colecciones extensas. Tener una colección caracterizada permite un manejo eficiente y facilita la elección de accesiones con características particulares para trabajos de fitomejoramiento (Jain y Brar, 2010).

Actualmente son escasos los trabajos donde se haya realizado estudios de caracterización morfológica, citogenética o molecular (Sørensen, 1988, Estrella et al. 1998, Talledo et al., 1999) de las especies cultivadas de *Pachyrhizus*, a diferencia de la cantidad de trabajos donde se cuenta con caracterización agronómica (Annerose y Diouf, 1994; Pedersen, 2004; Fassola et al., 2007 y Zanklan et al., 2006).

Esta tesis tiene por objetivo realizar un estudio citogenético y molecular de las accesiones de *Pachyrhizus* pertenecientes al banco de germoplasma del CIP. Se desea determinar el nivel de ploidía mediante conteo de cromosomas en células meristemáticas de

raíz y luego generar marcadores moleculares del tipo polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP por sus siglas en inglés) que den un mejor alcance de la variabilidad genética presente en el género y las relaciones que se pueden establecer entre las especies de dicho género.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 EL GÉNERO Y LAS ESPECIES

El género *Pachyrhizus* Rich. ex DC. pertenece a la familia Fabaceae, tribu Phaseoleae, subtribu Glycininae (Doyle y Doyle, 1993; Lee y Hymowitz, 2001 y Espert et al., 2008). Comprende cinco especies: *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban, *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi, *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Sprengel, *Pachyrhizus ferrogineus* (Piper) Sørensen y *Pachyrhizus panamensis* Clausen (Sørensen, 1988).

Dentro del género existe gran variación con respecto al porte y hábito de la planta, la mayoría son plantas herbáceas de tallo voluble o erecto, algunas llegan a lignificarse y ser plantas perennes presentando así un porte arbustivo y pueden tener una o más raíces tuberosas. Entre las características que comparten están las hojas trifoliadas, la inflorescencia tipo racimo con cáliz tubular y corola papilionada. El ovario presenta un nectario basal en forma de disco. El estilo es curvo y ciliado ventralmente y posee un estigma subgloboso. La legumbre es septada y las semillas pueden ser aplanadas y cuadradas o redondeadas con forma de riñón (Sørensen, 1996).

Otra característica del género es la presencia de rotenona y pachyrhizina en las semillas en cantidades tóxicas, en las hojas y en las raíces en crecimiento en menor cantidad mas no se ha detectado en las raíces maduras. Estos isoflavonoides tienen un efecto insecticida que podrían otorgar una ventaja ecológica al cultivo contra los insectos depredadores (Villar y Valio, 1994; Sørensen, 1996).

Las especies cultivadas del género son *P. erosus*, *P. ahipa* y *P. tuberosus* y a continuación se detallará mas acerca de su distribución y morfología.

2.1.1 *Pachyrhizus erosus* (L.) Urban

Esta especie se distribuye de manera silvestre en México, en los estados de Guanajuato, San Luis Potosí, Michoacán, Morelos, Puebla, Guerrero, Veracruz y Chiapas; centro y oeste de Guatemala; El Salvador; oeste de Honduras; oeste de Nicaragua y Noroeste de Costa Rica. Especies cultivadas se encuentran en el estado de Nayarit, Guanajuato y Yucatán, México (Sørensen, 1988).

Esta especie ha sido introducida en países lejanos a su centro de origen como África (Zanklan et al., 2006), India y aquellos pertenecientes al sureste de Asia (Filipinas, Tailandia, Indonesia, Malasia, Vietnam, Laos, Camboya, Burma, China y Taiwán) (Sørensen, 1996).

Las características propias de la especie son su porte herbáceo con tallo voluble, presenta una gran variación en el borde de los foliolos que pueden ser desde palmeados hasta dentados, carece de pubescencia en los pétalos y posee entre cuatro y once flores por eje de inflorescencia (6-13 cm); la legumbre es oblonga, acuminada, puede medir de 6 a 13 cm de largo y de 0.8 – 1.7 cm de ancho; las semillas son aplanadas con testa color verde olivo o marrón, poseen forma cuadrangular y nunca son reniformes (Figura 1) (Sørensen, 1988).

2.1.2 *Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi

Esta especie se distribuye en Bolivia y Perú, en valles fértiles que se encuentren entre 1500 – 2500 m.s.n.m. También se le cultiva en las provincias de Salta y Jujuy en Argentina, probablemente por introducción de semillas bolivianas (Sørensen, 1988 y Ørting et al., 1996, 1998).

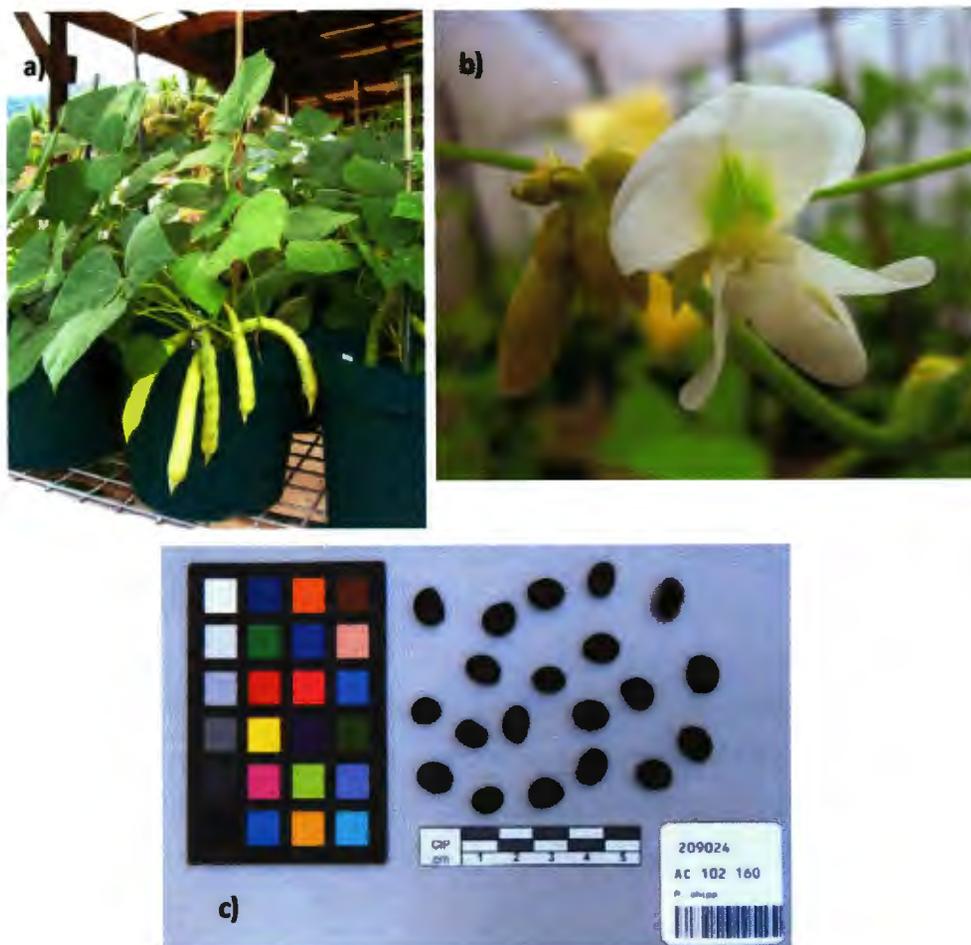
Figura 1. Características morfológicas de *P. erosus*. a) Hoja, semillas, legumbre y raíz. b) Porte herbáceo



P. ahipa es una planta de porte herbáceo con tallo voluble o erecto. De las tres especies es la que muestra menor variación en la morfología de las hojas, predominando las hojas con foliolos de borde entero. Presenta de dos a ocho flores por racimo con un eje de inflorescencia corto (4.8-9.2 cm). La legumbre es oblonga, hirsuta cuando es joven, glabra cuando es madura, puede medir de 9 a 17 cm de largo con 1.5 – 1.7 cm de ancho (Figura 2). Las semillas son reniformes y de testa color negro o moteadas negro con crema (Sørensen 1988, 1996).

Es importante resaltar que los dos tipos de hábito presentes en esta especie, presencia de tallo voluble o tallo erecto, se ubican en una distribución de norte a sur en Bolivia, al norte de Bolivia, cerca de la Paz, se encuentran plantas con hábito de tallo voluble y al sur, en Chuquisaca y Tarija, predominan el hábito de tallo erecto, también en Jujuy y Salta, Argentina (Sørensen, 1996).

Figura 2. Características morfológicas de *P. ahipa*. a) Porte herbáceo con frutos b) Flor e inflorescencia. c) Semillas.



2.1.3 *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Sprengel

P. tuberosus se distribuye ampliamente en la Amazonia de América del Sur, nativa de la zona oriental. Se ha colectado en Colombia, Venezuela, Guyana, Brasil, Bolivia, Perú, Ecuador y Paraguay (Sørensen, 1988).

Es la especie más robusta del género, algunas logran tallos que alcanzan los 7 m de largo, los folíolos suelen ser enteros de forma romboide alargada, pueden presentar dos lóbulos y raramente son dentados. Los ejes de inflorescencia pueden llegar a los 35.6 cm, las flores pueden ser blancas o variar entre claro-oscuro violeta azuláceo y la legumbre es oblonga y mide de 9 – 25 cm de largo con 1 – 2.3 cm de

ancho. Las semillas pueden ser reniformes o aplanadas, casi de forma cuadrada, con la testa color negro, moteadas blanco y negro o de color naranja-rojo (Sørensen, 1988, Oré et al., 2007).

Dentro de la especie existen cuatro grupos cultivares bastante diferenciados: Chuin, Ashipa, Yushpe y Jíquima (Oré et al., 2007).

El grupo cultivar Chuin crece en los suelos aluviales cercanos al río Ucayali, en los departamentos de Ucayali e Iquitos, Perú. Este grupo se puede subdividir en fenotipos de alto contenido de materia seca llamados pitichuin (o chuín simplemente por ser más abundante) amarillo, morado y blanco y fenotipos de bajo contenido de materia seca llamados cocotichuin amarillo y morado. El grupo puede producir una sola raíz o múltiples raíces tuberosas por planta (figura 3) (Sørensen, 1996; Oré et al., 2005 y Oré et al., 2007).

El grupo cultivar Ashipa se encuentra en Colombia, Venezuela, Ecuador, Brasil, Bolivia y Perú. Este grupo presenta fenotipos que producen múltiples raíces tuberosas aunque existe una accesión que produce solo una raíz (figura 4). Debido al bajo contenido en materia seca las raíces se consumen frescas (Oré et al., 2007).

El grupo cultivar Yushpe posee pocos especímenes que se encuentran a lo largo del río Ucayali, Perú. Se diferencia de Chuín en el foliolo terminal que es mucho más lobulado, las semillas son reniformes con pintas color negro. De Ashipa se diferencia por el tamaño más pequeño de sus hojas y legumbres y produce una sola raíz vertical (Oré et al., 2007).

El grupo-cultivar Jíquima es nativo de la costa de Ecuador, específicamente de la provincia de Manabí (Sørensen, 1996) y ocasionalmente en la provincia de Los Ríos. Es de porte herbáceo con variación en el borde de las hojas y en el color de las flores, encontrando fenotipos de flores blancas en Manabí y violetas en Los Ríos. Su ciclo vegetativo es de cinco meses (Tapia, 1998).

Figura 3. Características morfológicas de *P. tuberosus*, cultivar Chuin. Se observan dos fenotipos (a y b) correspondientes a la misma accesión.



Figura 4. Característica morfológicas de *P. tuberosus*, cultivar Ashipa



De las tres especies de *Pachyrhizus*, *P. ahipa* y *P. tuberosus* pertenecen al rubro de cultivos poco utilizados de raíces y tubérculos andinos (RTAs), al igual que la oca (*Oxalis tuberosa*), la maca (*Lepidium meyenii*), el yacón (*Smallanthus sonchifolius*), el olluco (*Ullucus tuberosus*), la mashua (*Tropaeolum tuberosum*) y la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*). Estos cultivos no han sido estudiados a profundidad a diferencia de los cultivos básicos (papa, camote, arroz, maíz, trigo etc.). Sin embargo han recobrado importancia porque poseen una valiosa diversidad

genética que les permite desarrollarse y prosperar en condiciones ambientales donde los cultivos básicos no lo logran además de una alta calidad nutricional (Hermann y Heller, 1997).

El potencial de las especies cultivadas del género *Pachyrhizus*, se basa en la calidad nutricional de sus raíces tuberosas, las que poseen de 13.7-30 por ciento de contenido en materia seca, 25-68.7 por ciento de almidón (basado en contenido de materia seca) y de 6.4-11 por ciento de contenido proteico. Los valores mas altos de porcentaje de materia seca y almidón son comparables a los de yuca (*Manihot esculenta*) y el contenido proteico de *Pachyrhizus* en general llega a ser tres veces mayor. Con respecto a minerales contiene en promedio 16-52 ppm de Fe, el doble de la cantidad del frejol (*Vigna unguiculata*) y 9 ppm de Zinc (Sørensen, 1996, Ratanadilok et al., 1996; Ørting et al., 1998, Zanklan et al., 2006 y Heider et al., 2011). Este cultivo además puede ser consumido fresco, cocido o en productos preparados como almidón, harina y hojuelas

Además, como leguminosas tienen la capacidad de fijar nitrógeno lo cual disminuiría la necesidad de utilizar fertilizantes adicionales, desempeñando así un rol importante en la rotación de cultivos o en asociación con otros cultivos como el maíz, arroz o yuca (Sørensen, 1996; Oré et al., 2005). Estas características junto con la adaptabilidad de estas especies y cultivares a sus lugares de origen hacen que este alimento sea ideal para aliviar la desnutrición en zonas rurales. Con el fin de utilizar este potencial en programas de mejoramiento es necesario empezar por estudios de caracterización del germoplasma disponible.

2.2 CARACTERIZACIÓN DE RECURSOS FITOGENÉTICOS

Los recursos fitogenéticos para la alimentación y la agricultura se refieren a toda la diversidad genética presente en las especies vegetales, cultivadas o silvestres, que presentan un valor inmediato o un valor potencial para el futuro en la alimentación o la agricultura. Estos recursos son finitos y actualmente peligran debido a la erosión genética causada tradicionalmente por la domesticación hace 10000 años de parte del hombre y actualmente por la agricultura moderna y la introducción de modernos cultivares que son preferidos respecto a cultivares tradicionales (Tanksley y McCouch, 1997 y Upadhyaya et al., 2008).

Debido a que los recursos fitogenéticos son el material base para la selección y el mejoramiento de los cultivos, es necesario conservar la diversidad genética disponible aún para que estos sean capaces de hacer frente a nuevas pestes o enfermedades o presentar una mayor adaptación al cambio climático. La colecta, conservación y estudios de los recursos fitogenéticos es fundamental para la seguridad alimentaria (Upadhyaya et al., 2006, 2008).

Para el buen manejo de estos recursos es necesario llevar a cabo estudios de caracterización y evaluación del germoplasma. Los estudios de caracterización tienen como objetivo la descripción, identificación y clasificación de las accesiones y pueden ser del tipo morfológico, bioquímico, molecular, etc. Los estudios de evaluación tienen como objetivo encontrar aquellas características de interés agronómico que normalmente se ven influenciadas por el ambiente así como el efecto de este sobre el fenotipo para facilitar el posterior uso por parte de los mejoradores (Martín, 2001).

Como el mantenimiento y estudio de todas las accesiones pertenecientes a un banco de germoplasma es una tarea exhaustiva que se debe llevar a cabo con limitados recursos. Muchas veces es necesario priorizar el uso de estos recursos sobre colecciones núcleo. Las colecciones núcleo son muestras representativas de la diversidad genética del total de accesiones de un cultivo determinado con un mínimo de repetitividad (Frankel, 1984). El objetivo es mediante la caracterización y evaluación, llegar a identificar aquellas accesiones que albergan la mayor diversidad posible. Las accesiones que quedan excluidas de la colección núcleo son retenidas y forman parte de la colección de reserva. Para el desarrollo de la colección núcleo se suele tomar el diez por ciento del total de accesiones que contenga

el 70 por ciento de alelos de la colección original. Para colecciones extensas donde diez por ciento es aún un gran número de accesiones se recomienda un máximo de 3000 accesiones (Brown, 1995 y Upadhyaya y Gowda, 2009).

2.3 CARACTERIZACIÓN CITOGÉNÉTICA

La citogenética estudia el ciclo celular y el comportamiento de los cromosomas durante todo el proceso de división y herencia. Uno de los principales objetivos al estudiar un cultivo es determinar su número básico (x), es decir el número equivalente a un juego de cromosomas, y si existen diferentes niveles de ploidía ($2x$, $3x$, $4x$...). La técnica más empleada y fiable para ese fin es el conteo de cromosomas en meristemas radiculares. Esta técnica es práctica y permite la observación directa, el análisis estructural (duplicaciones y translocaciones) y cambios numéricos en los cromosomas (poliploidía, haploidía y aneuploidía), fenómenos que ocurren frecuentemente durante el proceso de evolución de las plantas, especialmente en angiospermas (Lacadena, 1996, Singh, 2002, Hancock, 2003).

Para los estudios cromosómicos en plantas se pueden utilizar distintos tejidos como puntas de raíz, puntas de hojas, granos de polen, endospermo, tubo polínico y botones florales. Según Sharma y Sharma (1980) los pasos a seguir para la observación de los cromosomas son básicamente cuatro:

1. *Pre- fijación*: en la cual se trata de clarificar el citoplasma, suavizar el tejido separando la lamela media y principalmente detener la mitosis inhibiendo la formación del huso acromático y dispersar y condensar los cromosomas. Entre los más utilizados están la colchicina, la 8-hidroxiquinolina y el α -bromonaftaleno (Talledo y Escobar, 1999)

2. *Fijación*: En esta etapa se retiene a las células del tejido en una determinada fase sin causar distorsión alguna en los componentes a estudiar, en este caso para mantener la estructura de los cromosomas intactos y también se previene la descomposición del tejido por parte de bacterias. Los fluidos fijadores más utilizados son: el alcohol, el ácido acético, el cloroformo y el isopropanol, es común que se utilicen mezclas de varios de estos para lograr una mejor fijación.

3. *Hidrólisis*: o reblandecimiento del tejido, puede ser lograda por hidrólisis con ácido clorhídrico (HCl) que disuelve la pectina de la lamela media o también mediante tratamientos enzimáticos, pectinasas.

4. *Tinción*: paso básico para facilitar la observación de los cromosomas bajo el microscopio. Los colorantes pueden ser de naturaleza acida o básica, algunos usados para la tinción de cromosomas son anfotericos, es decir se comportan como ácidos o bases, entre ellos esta la orceína, derivados de la anilina y el trifenil metano.

Anteriormente se han realizado trabajos citogenéticos por conteo de cromosomas en meristemos radiculares en *P. tuberosus* y *P. ahipa*, donde reportan que ambas especies son diploides ($2n = 2x = 22$) y sostienen que el número cromosómico en este género y otros del orden *Phaseoleae* es bastante estable (Talledo et al., 1999). Actualmente no se cuenta con mayor información acerca de la caracterización citogenética en este género, y si existe no está disponible. Uno de los objetivos de este trabajo es determinar el número básico (x) y el nivel de ploidia de las especies cultivadas y los híbridos interespecíficos de las accesiones pertenecientes al banco de germoplasma del CIP.

2.4 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE MARCADORES AFLP (POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS)

La caracterización molecular se refiere a la detección de polimorfismos en secuencias aleatorias o en genes específicos del ácido desoxirribonucleico (ADN) con la finalidad de conocer la variación genética presente en una colección de germoplasma. Una de las principales ventajas de los marcadores moleculares con respecto a la caracterización morfológica es que los resultados son independientes de factores que pueden alterar los caracteres morfológicos como la etapa de crecimiento y el medio ambiente en general (Narváz et al., 2000; Jain y Brar, 2010).

Los marcadores moleculares pueden ser generados en base a tres técnicas: (1) de hibridación como los polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP), (2) basados en PCR como polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados (AFLP), microsatélites (SSR), polimorfismos de ADN amplificado aleatoriamente (RAPD) y (3) los

marcadores basados en secuencia como los polimorfismos de un solo nucleótido (SNP), tecnología de matrices de diversidad (DARTs), y los polimorfismos de secuencia única (SFP). Todas tienen como finalidad permitir el análisis de la variación genética para ser aplicado en la realización de mapas moleculares, genética de poblaciones, análisis filogenético y en mejoramiento asistido por marcadores (Jain y Brar, 2010). Dependiendo de los objetivos del estudio, el conocimiento del cultivo, el nivel de polimorfismo, las facilidades técnicas, el tiempo y los recursos financieros, se elige el tipo de marcador más conveniente.

Los marcadores AFLP se fundamentan en la amplificación de un sub-juego de fragmentos genómicos de restricción, el polimorfismo observado en los perfiles AFLPs es el resultado de la variación en la secuencia de aquellos sitios (Vos et al., 1995). Entre las ventajas de la técnica destacan la gran cobertura del genoma, la posibilidad de ser utilizada para cualquier organismo sin previa información de secuenciamiento, su precisión y la alta reproducibilidad de los perfiles obtenidos. Una desventaja es la imposibilidad de detectar heterocigotos ya que en el perfil generado solo se observa la presencia o ausencia de fragmentos de un determinado tamaño, por lo tanto es un marcador dominante (Jones et al., 1997, Mueller y Wolfenbarger, 1999 y Spooner et al., 2005).

Para poder realizar la técnica es necesario contar con ADN de buena calidad y de alto peso molecular. En general, la técnica consiste en cuatro pasos: digestión, ligación, amplificación pre- selectiva y amplificación selectiva.

Primero el ADN es digerido con dos enzimas de restricción, una de corte poco frecuente, como EcoRI y una de corte frecuente, como MseI, los fragmentos que son amplificados son en su mayoría aquellos que tienen ambas secuencias de restricción pertenecientes a cada enzima. Seguidamente los fragmentos son ligados a adaptadores de doble hebra, el diseño del adaptador es de tal manera que no reconstituya la secuencia de restricción. La secuencia de los adaptadores y la secuencia de restricción ahora, servirán como sitio blanco para los iniciadores.

En la amplificación preselectiva se utilizan iniciadores sin nucleótidos selectivos con la finalidad de disminuir la cantidad de fragmentos generados y eliminar los posibles fragmentos que presenten en sus dos extremos la misma secuencia correspondiente a una sola

enzima de restricción. En la amplificación selectiva, se utilizan iniciadores que pueden contener hasta cuatro nucleótidos selectivos para ambos iniciadores, estos arrojarán sub-juegos de fragmentos de aquellos que amplificaron en la preselectiva (Vos et al., 1995). Finalmente se corre en un gel de secuenciamiento y se revela para observar y analizar el perfil.

2.5 ANÁLISIS FILOGENÉTICO

Los análisis filogenéticos tienen por objetivo inferir la historia evolutiva de un grupo de organismos a partir de las relaciones que se puedan establecer entre ellos, los datos a partir de los cuales se genera la información pueden ser morfológicos, anatómicos, químicos, moleculares, etc. Para estos estudios cada individuo (o taxón) adopta el nombre de unidad taxonómica operacional (OTU) (Spooner et al., 2005; Simpson, 2006)

Existen dos enfoques para el análisis sistemático, el fenético y el cladístico. El primero asume que el cambio evolutivo de ciertos caracteres es una constante en el tiempo por lo tanto no se puede determinar la historia evolutiva de los organismos sino solo la similitud general entre estos, genera fenogramas en caso los datos sean fenotípicos morfológicos o dendrogramas si estos son moleculares. En el segundo enfoque, se toma en cuenta la cercanía evolutiva entre los individuos y las características compartidas entre los miembros de un grupo, las relaciones evolutivas se determinan comparando el grupo de interés “ingroup”, considerado monofilético, con otro grupo cercano denominado “outgroup”, genera cladogramas (Simpson, 2006).

Se recomienda usar el análisis fenético para datos pertenecientes a una sola especie o especies bastante relacionadas. El análisis cladístico es recomendable para niveles taxonómicos superiores o para grupos donde se pueda contar con “outgroups” fácilmente (Spooner et al., 2005; Simpson, 2006).

2.6 ÍNDICES DE DIVERSIDAD.

Para realizar los análisis de diversidad/proximidad entre poblaciones a partir de marcadores moleculares se debe elegir el coeficiente de similaridad mas apropiado de acuerdo al tipo de marcador utilizado y la ploidía de los individuos a comparar.

Los coeficientes más utilizados para la construcción de matrices de similaridad son los de Jaccard (J), Dice (D) y el de emparejamiento simple (M), para dos individuos i_1 e i_2 son:

$$J_{(i_1,i_2)} = a/(a+b+c)$$

$$D_{(i_1,i_2)} = 2a/(2a+b+c)$$

$$M_{(i_1,i_2)} = (n-b-c)/n$$

Donde a es el número de posiciones con bandas compartidas para cada individuo, b es el número de posiciones donde i_1 presenta bandas pero i_2 no, c es el número de posiciones donde i_2 presenta bandas pero i_1 no y n es el número de bandas polimórficas (Spooner et al., 2005). Fácilmente se puede observar que los índices de Jaccard y Dice difieren del Emparejamiento simple en que no toman en cuenta la ausencia compartida de bandas como indicador de similaridad (Dalirsefat et al., 2007)

Para marcadores codominantes tipo RFLP y SSR, cada alelo de un locus determinado es visible a través de una banda en una posición específica, por lo tanto se diferencian los genotipos homocigotos y heterocigotos, y la ausencia compartida de bandas no ha de considerarse como una medida de similaridad. Kosman y Leonard (2005) demostraron que para individuos haploides se recomienda el uso del coeficiente de emparejamiento simple y el de Dice; para individuos diploides o poliploides no recomiendan el uso directo de ninguno de los índices, sin embargo si se convierte el patrón multialélico en homocigoto y heterocigoto se podría analizar la similaridad pero a nivel fenotípico (Kosman y Leonard, 2005).

En el caso de marcadores dominantes tipo RAPDs, AFLPs e ISSRs se asume que cada banda representa un locus determinado y la ausencia compartida de bandas podría indicar similaridad, dependiendo de cuan relacionados sean los individuos a analizar. Para

individuos haploides Kosman y Leonard (2005) recomiendan utilizar los índices de Jaccard y Dice, para individuos diploides o poliploides la imposibilidad de determinar si un individuo es homocigoto o heterocigoto solo permite estimar la similaridad fenotípica, para este fin se puede utilizar cualquiera de los tres índices de similaridad descritos (Kosman y Leonard, 2005 y Dalirsefat et al. 2007).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 OBTENCIÓN DEL MATERIAL VEGETAL

Se obtuvieron 46 accesiones de *Pachyrhizus* spp. (Cuadro 1) mediante germinación de semillas del banco de germoplasma del CIP. Las semillas se desinfectaron en lejía comercial al 50% durante 7 minutos y se enjuagaron en agua destilada, las semillas de *P. erosus*, *P. tuberosus* y los híbridos fueron previamente escarificadas con ayuda de un bisturí, enseguida se sumergieron en agua destilada por 24 horas y después se dispusieron en cámaras húmedas (placas petri 100 x 15 mm con papel filtro húmedo en la base) para su germinación a una temperatura de 25 °C.

Las semillas que germinaron se sembraron en Jiffy-7 (sustrato prensado) para estimular el crecimiento de raíces y luego las plántulas se trasladaron a macetas con Pro-Mix (Premier Tech Horticulture, Québec, Canadá) como sustrato. Se tomaron fotos a manera de registro de las semillas y del proceso de germinación.

Todo el material vegetal se mantuvo en un cobertor dentro de las instalaciones del CIP. Los datos de temperatura y humedad se tomaron cada hora con un HOBO *data logger* (Onset, Massachusetts, USA). Las pruebas de germinación se llevaron a cabo a partir del 6 de Mayo del 2010.

Cuadro 1. Accesiones de *Pachyrhizus* pertenecientes al banco de germoplasma del CIP utilizadas en los estudios citogenético y molecular.

# CIP	# Col	Origen	Especie
209003	AC 521	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209004	AC 524	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209005	MH 1167	BRA	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209006	AC 102	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209007	AC 525	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209010	MH 990	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209011	AGH 5569	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209013	TC 354	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209014	TC 351	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209015	TC 361	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209016	EC 041	GTM	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209017	EC 114	BRA	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209018	EC 533	CHN	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209019	EC KEW	MEX	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209020	TC 362	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209021	AC 526	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209022	AC 102 146	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209023	AC 102 153	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209024	AC 102 160	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209025	AC 521 176	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209026	AC 521 177	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209027	AC 521 183	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209028	AC 524 164	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209029	AC 524 168	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209030	AC 524 169	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209031	AC 525 170	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209032	AC 525 171	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209033	AC 525 172	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209034	AC 526 173	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209035	AC 526 174	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209036	AC 526 175	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>
209037	AC 102 153 x TC 353	-	HYB
209038	AC 102 153 x TC 355	-	HYB
209039	AC 102 153 x TC 361	-	HYB
209040	AC 524 164 x TC 353	-	HYB
209041	AC 524 164 x TC 359	-	HYB
209042	AC 524 164 x TC 361	-	HYB
209044	AC 525 170 x TC 360	-	HYB
209045	AC 525 170 x TC 361	-	HYB
209049	-	MEX	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209050	-	-	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209051	-	MEX	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209052	-	TON	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209053	-	TON	<i>Pachyrhizus erosus</i>
209056	-	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>
209057	-	-	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>

3.2 DETERMINACIÓN DE PLOIDÍA EN CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍCES DE *Pachyrhizus*

Se realizaron pruebas preliminares con cinco accesiones seleccionadas al azar (CIP 209013, CIP 209014, CIP 209016, CIP 209018 y CIP 209020) para determinar la hora con mayor índice de metafases para la colecta de raíces. El protocolo a seguir fue el propuesto por Orjeda (1990) con algunas modificaciones: Se utilizó 8-Hidroxiquinolina (0.002 M) como pre-fijador de las raíces durante cuatro horas a 4°C (Talledo y Escobar 1999), luego enjuagaron con agua destilada y se agregó el fijador Farmer (3:1 etanol absoluto: ácido acético glacial) (Sharma y Sharma, 1980) y se conservaron a temperatura ambiente durante 24 horas. Después se procedió con la hidrólisis ácida de la pared celular para la cual se sumergieron las raíces en viales con HCl 1 N a 60°C por 25 minutos, luego se enjuagaron con agua destilada. Se añadieron 2 ml del colorante aceto orceína (0.02 g/ml) y se dejaron reposando por 24 horas.

Para observar las raíces al microscopio se seleccionaron las raíces más gruesas y se colocaron en una lámina portaobjeto. Con un bisturí y una pinza se cortaron los meristemos (aproximadamente 1 mm de largo) y se cubrieron con un cubreobjetos procurando eliminar posibles burbujas de aire. Para disgregar las células se golpea con la punta de un lápiz sobre cada una de ellas y luego se aplica presión con el dedo pulgar. Finalmente se observó al microscopio.

Para documentar lo observado se utilizó una cámara Olympus C5060 (Tokyo, Japón) adaptable al microscopio de la misma marca, Olympus CX31.

Para determinar el nivel de ploidía se evaluaron tres individuos por accesión. Tres células por raíz y tres raíces por individuo. A partir de la moda calculada se determinó el nivel de ploidía.

3.3 EXTRACCIÓN DE ADN

Las muestras de ADN se prepararon según el protocolo propuesto por el manual del CIP “Molecular Biology Laboratory Protocols” con algunas modificaciones (Ghislain et al. 1999, Anexo 6):

Se colectaron de 1 a 2 foliolos jóvenes por individuo en 700 ul de tampón CTAB 2x con 2ul de β -mercaptoetanol en tubos Eppendorf (Hamburg, Alemania). Para triturar el tejido se agregó a cada tubo una perlita de cerámica y se llevo al Fastprep®-24 (Qbiogene, California, USA) por 40 segundos. Luego se sumergió en baño maría a 65°C durante 30 minutos, agitando suavemente los tubos cada 10 minutos. La extracción con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) se llevo a cabo dos veces de acuerdo al protocolo.

Luego se agregó 400 ul de isopropanol frio a cada tubo y se llevo a -20°C por 15 minutos. Luego se centrifugó por 10 minutos a 14,000 rpm y se eliminó el sobrenadante cuidadosamente para no perder el pellet de ADN. Se dejo secar los tubos a medio ambiente por dos minutos. Se lavó el pellet de ADN con 500 ul de alcohol al 70% y se centrifugó cinco minutos a 14,000 rpm. Seguidamente se realizó un segundo lavado con alcohol al 90% y se centrifugó cinco minutos a 14,000 rpm nuevamente. Se eliminó el alcohol y se dejo secar el pellet durante una noche.

Finalmente se disolvió el pellet en 100 ul de tampón T₁₀E₁ y se agregó 1 ul de RNAsa libre de DNAsa (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 1.5 horas. Se almacenó a -20°C.

La calidad de ADN se evaluó en geles de agarosa al 1% y la concentración se determinó por espectrofotometría (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA).

3.4 PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA AFLP

El protocolo para el desarrollo de AFLPs se llevo a cabo según lo propuesto por el manual del CIP “Molecular Biology Laboratory Protocols” (Ghislain et al. 1999, Anexo 7) con algunas modificaciones.

De cada muestra de ADN se tomó un volumen equivalente a 3000 ng y se completó con agua libre de nucleasas (NFW) hasta 10 ul.

La muestra fue digerida con dos enzimas de restricción (MseI y EcoRI, ambas de *New England BioLabs*, Massachusetts, USA). Por reacción se utilizó: 4 ul de tampón restricción – ligación (5x R-L), 2 ul de NaCl 0.5M, 0.2 ul de BSA (10 mg/ml), 0.25 ul de MseI (10U/ul), 0.125 ul de EcoRI (20U/ul) y 3.425 ul de NFW. Se incubó a 37°C por tres horas.

Los fragmentos de ADN obtenidos fueron ligados con adaptadores EcoRI y MseI. Por reacción se utilizó: 1 ul de 5x R-L, 0.5 ul de NaCl, 0.05 ul de BSA (10 mg/ml), 1.933 ul de NFW, 0.5 ul de Mse (A_1+A_2) 50 uM, 0.5 ul de Eco (A_1+A_2) 5 uM, 0.017 ul de T4 ligasa (2000000 U/ml, de *New England BioLabs*) y 0.5 ul de ATP 10 mM. Se incubó de 16-18 horas a temperatura ambiente, seguidamente se diluyó 1:8 con tampón T₁₀E_{0.1}.

3.4.1 INICIADORES AFLP

Se utilizaron dos iniciadores preselectivos (no cargaban ningún nucleótido selectivo), E00 y M00. Para la amplificación selectiva se utilizaron iniciadores con 3 nucleótidos selectivos, EcoRI+3 y MseI+3. Se realizó un tamizado de distintas combinaciones de 33 iniciadores (cuadro 2) basándose en regiones de alto polimorfismo en un cuadro de doble entrada de ambos tipos de iniciadores para finalmente escoger aquellos con el mayor porcentaje de polimorfismo (anexo 1).

Cuadro 2. Secuencias de los iniciadores EcoRI y MseI. Los iniciadores E00 y M00 no poseen nucleótidos selectivos por lo tanto se muestran las secuencias núcleo

Código EcoRI	Secuencia (5'-3')	Código MseI	Secuencia (5'-3')
E00	5-GACTGCGTACCAATTC-3	M00	5'-GATGAGTCTGAGTAA-3'
E32	AAC-3	M35	ACA-3
E33	AAG-3	M36	ACC-3
E34	AAT-3	M37	ACG-3
E35	ACA-3	M38	ACT-3
E36	ACC-3	M39	AGA-3
E37	ACG-3	M40	AGC-3
E38	ACT-3	M42	AGT-3
E39	AGA-3	M45	ATG-3
E40	AGC-3	M47	CAA-3
E41	AGG-3	M48	CAC-3
E42	AGT-3	M49	CAG-3
E43	ATA-3	M50	CAT-3
E44	ATC-3	M54	CCT-3
E45	ATG-3	M55	CGA-3
E46	ATT-3	M57	CGG-3
		M58	CGT-3
		M59	CTA-3
		M61	CTG-3

3.4.2 AMPLIFICACIÓN PRESELECTIVA

Se preparó una reacción que contenga 20 ul de volumen final: 10 ul de mezcla de reacción más 10 ul de muestra. Por reacción se utilizó: 7.075 ul de NFW, 1.25 ul de tampón PCR 10x, 0.625 ul de dNTPs (Invitrogen, California, USA), 0.5 ul de iniciador E00 (50 ng/ul), 0.5 de iniciador M00 (50 ng/ul) y 0.05 de Taq polimerasa (5U/ul). Luego se realizaron 20 ciclos de amplificación (94 °C por 30 s, 56 °C por 60 s y 72 °C por 60 s). Seguidamente se diluyó 1:8 con tampón T₁₀E_{0.1}. De no continuar con la amplificación selectiva inmediatamente, se almacenó -20°C.

3.4.3 AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Se preparó una reacción que contenga 10 ul de volumen final: 5 ul de mezcla de reacción más 5 ul de pre-selectiva. Por reacción se utilizó: 0.84 ul de NFW, 1.10 ul de tampón PCR 10x, 0.6 ul de dNTPs, 2 ul de iniciador EcoRI+3 (50 ng/ul), 0.3 de iniciador MseI+3 (50 ng/ul) y 0.16 de Taq polimerasa (5U/ul). Luego se realizó el siguiente ciclo de amplificación: 94 °C por 20 s, 66 °C por 30 s y 72 °C por 120 s, la temperatura de alineamiento fue disminuyendo un grado por ciclo hasta llegar a 56°C, se mantuvo así 20 ciclos adicionales y la extensión final se realizo a 60°C por 30 minutos. Se desnaturalizó con 5ul de tampón de carga a 94°C por cinco minutos para correr en gel inmediatamente, de lo contrario se almacenó a -20°C.

El análisis se llevó a cabo en un gel de poliacrilamida (Sigma Aldrich, Missouri, USA) al 6% con urea 7M. La preparación del gel, la corrida electroforética, la tinción con nitrato de plata y el revelado con carbonato de sodio se llevó a cabo según el protocolo propuesto por el manual del CIP “Molecular Biology Laboratory Protocols” (Ghislain et al. 1999, Anexo 8-9).

Como referencia se utilizó un marcador de peso de 30-330 bp AFLP DNA ladder (*Invitrogen*). Solo se tomaron en cuenta los fragmentos con un peso mayor a 100 bp.

3.4.4 ANÁLISIS DE DATOS

Para el análisis de los datos AFLP, se tradujo la presencia/ausencia de bandas en matrices de 0s y 1s en hojas de cálculo de Excel, luego se utilizó el software DARwin5 software (Perrier et al., 2003) para realizar el análisis de coordenadas principales (PCoA) que muestre la distribución de las especies de *Pachyrhizus* en un eje de coordenadas. El programa NTSys- pc version 2.10p (Rohlf, 2000), se utilizó para hallar matrices de disimilaridad y dendrogramas. En ambos se utilizó el índice de Jaccard para el análisis de disimilaridad. Finalmente para estimar la diferenciación entre las especies e individuos se utilizó el programa Arlequin 3.0 (Excoffier et al., 2005) para los análisis de varianza molecular AMOVA.

Para evaluar el grado de diversidad genotípica encontrado por AFLPs intra especies, se utilizó el índice de diversidad de Shannon, H_s , (Maughan et al. 1996 y Weising et al. 2005).

$$H_s = - \sum f_i \ln f_i$$

Donde f_i es la frecuencia de un determinado patrón de bandas AFLP para un determinado grupo. Y la diversidad genotípica de todos los individuos considerados juntos sería:

$$H_w = - \sum f \ln f$$

Donde f es la frecuencia de un determinado patrón de bandas AFLP observado en todos los grupos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 CONTEO DE CROMOSOMAS

El conteo de cromosomas se realizó con cinco accesiones seleccionadas al azar (CIP 209013, CIP 209014, CIP 209016, CIP 209018 y CIP 209020) a manera de prueba y estandarización del protocolo. En la primera colecta de raíces no se pudo observar cromosomas, incluso se apreció que en la mayoría de células la pared permanecía intacta, de manera que se incrementó el tiempo de hidrólisis ácida (HCl 1N) en 5 minutos, siendo 25 minutos en total a 60°C.

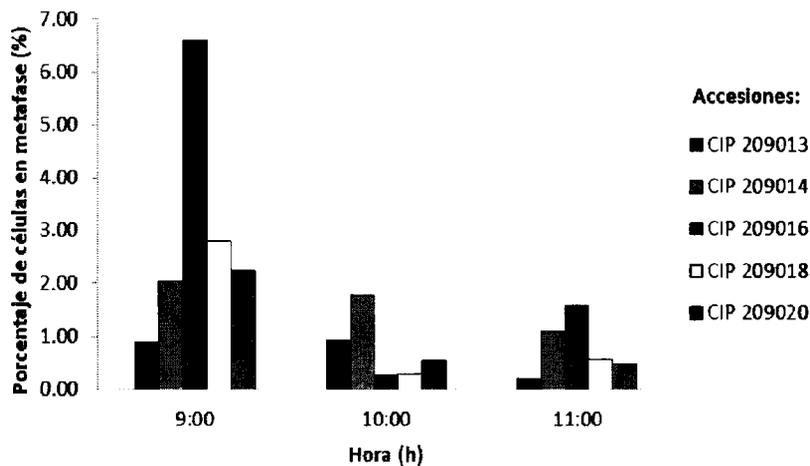
Pressey (1993) demostró que la composición de la pared celular de *Pachyrhizus erosus* era rica en polisacáridos (arabinosa, ácido glucorónico y xilosa) y tenía un bajo contenido de polisacáridos pécticos, a diferencia de la papa. También se probó que los polisacáridos mencionados proveían una mayor resistencia a la descomposición por calor de la pared celular. Probablemente esto explicaría que las paredes estuvieran presentes aun luego de 20 minutos de hidrólisis ácida. Con el tiempo incrementado (25 minutos) se pudo observar buenos resultados en las tres especies y los híbridos.

Luego del primer ajuste en el tiempo de hidrólisis se pudo realizar la observación de células sin pared pero los cromosomas aun no estaban muy condensados como para facilitar su conteo. Talledo y Escobar (1999) realizaron un estudio comparativo de inhibidores de mitosis, en el cual sometieron especies vegetales nativas peruanas a diferentes pre-fijadores y diferentes temperaturas. Evaluaron frecuencia de metafases, dispersión y acortamiento de cromosomas. Para todos los casos los mejores resultados se observaron entre 4-6 °C. Por lo tanto se ajustó la pre-fijación almacenando las raíces recolectadas a 4°C durante el mismo lapso de tiempo (4 horas). Con este último ajuste la observación y conteo se pudo realizar fácilmente.

En la primera colecta las condiciones fueron en promedio 27°C de temperatura ambiental y un 59% de humedad relativa y solo se observaron interfases para las 13:00h, 14:00h y 15:00h. En la segunda colecta para las 9:00h, 10:00h y 11:00h las condiciones fueron de 25.7°C de temperatura ambiental y 64.89% de humedad relativa. Esta vez se pudo

encontrar y contar cromosomas en las muestras. En las tres primeras accesiones observadas CIP 209014, CIP 209016 y CIP 209020 se encontró un alto porcentaje de metafases para las 9:00h. Cuando se observaron las muestras de las dos accesiones restantes, también se observó un mayor porcentaje de metafases a las 9:00h sin embargo, no fue tan marcado (Figura 5). Probablemente fue consecuencia de la diferencia en el tiempo de colecta ya que ésta se realizó en época de transición verano- invierno donde la temperatura promedio fue 22.8°C y la humedad relativa: 71.9. Estos parámetros variaban mucho y son decisivos en la toma de muestra pues la metafase puede ocurrir en 1/10 de todo el tiempo requerido para ciclo celular (Talledo y Escobar, 2004). Se puede concluir que para garantizar una alta frecuencia de metafases, la colecta de raíces se debe realizar a 25°C con una humedad relativa del 65%; dependiendo de la estación estas condiciones se pueden dar entre las 9:00am y las 14:00pm.

Figura 5. Porcentaje de células en metafase para las accesiones de *Pachyrhizus* con las que se realizaron las pruebas preliminares.

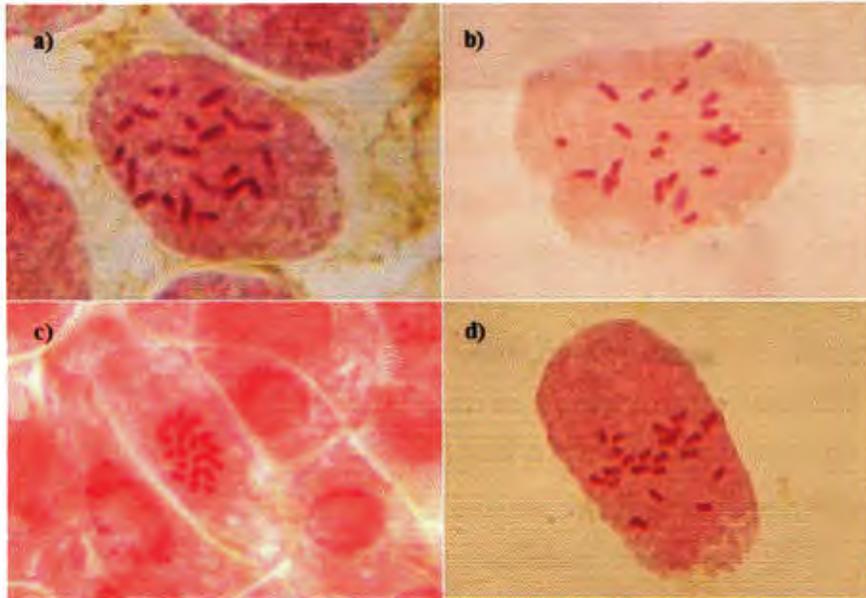


Después de los ajustes en tiempo de hidrólisis y temperatura de pre- fijación se evaluaron 39 accesiones (20 *P. ahipa*, 5 *P. erosus*, 6 *P. tuberosus* y 8 híbridos). Todos los individuos fueron diploides ($2n= 2x = 22$) con un número básico igual a 11 ($x= 11$) (cuadro 3, figura 6). Esto es consistente con lo reportado anteriormente para la familia *Fabaceae*, en la cual el número básico varía entre 6 y 12 (Hilu, 1993) y coincide con los resultados de Talledo et al. (1999) para *P. ahipa* y *P. tuberosus*.

Cuadro 3. Ploidía y número cromosómico para 39 accesiones de *Pachyrhizus*. Todas fueron diploides con $2n=2x=22$

# CIP	# Colector	Origen	Especie	Ploidía
209003	AC 521	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209004	AC 524	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209005	MH 1167	BRA	<i>Pachyrhizus erosus</i>	2x =22
209006	AC 102	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209007	AC 525	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209010	MH 990	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209011	AHG 5569	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209013	TC 354	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209014	TC 355	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209015	TC 361	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209016	EC 041	GTM	<i>Pachyrhizus erosus</i>	2x =22
209017	EC 114	BRA	<i>Pachyrhizus erosus</i>	2x =22
209018	EC 533	CHN	<i>Pachyrhizus erosus</i>	2x =22
209019	EC Kew	MEX	<i>Pachyrhizus erosus</i>	2x =22
209020	TC 362	PER	<i>Pachyrhizus tuberosus</i>	2x =22
209021	AC 526	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209022	AC 102 146	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209023	AC 102 153	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209024	AC 102 160	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209025	AC 521 176	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209026	AC 521 177	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209027	AC 521 183	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209028	AC 524 164	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209029	AC 524 168	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209030	AC 524 169	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209031	AC 525 170	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209032	AC 525 171	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209033	AC 525 172	BOL	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209034	AC 526 173	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209035	AC 526 174	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209036	AC 526 175	ARG	<i>Pachyrhizus ahipa</i>	2x =22
209037	AC 102 153 x TC 353	-	HYB	2x =22
209038	AC 102 153 x TC 355	-	HYB	2x =22
209039	AC 102 153 x TC 361	-	HYB	2x =22
209040	AC 524 164 x TC 353	-	HYB	2x =22
209041	AC 524 164 x TC 355	-	HYB	2x =22
209042	AC 524 164 x TC 361	-	HYB	2x =22
209044	AC 525 170 x TC 355	-	HYB	2x =22
209045	AC 525 170 x TC 361	-	HYB	2x =22

Figura 6. Microfotografías de células en metafase mostrando 22 cromosomas condensados para: a) *P. ahipa* (CIP 209004), b) *P. tuberosus* (CIP 209014), c) *P. erosus* (CIP 209019) y d) Híbrido: *P. ahipa* x *P. tuberosus* (CIP 209045). Grado de aumento: 100x



La poliploidía no se caracteriza necesariamente por robustecer a la planta, a nivel de los tejidos hay una mayor acumulación de agua por presentar una mayor relación volumen/superficie en células meristemáticas y se ve incrementado el contenido de distintos metabolitos u otros compuestos (vitaminas, clorofila, hormonas). También puede presentarse esterilidad parcial o total (Stebbins, 1950). Por esta razón fue importante caracterizar el total de accesiones de la colección pues no se podría determinar solo por marcadores morfológicos si es que existen poliploides.

Dentro de los cultivos considerados como RTAs, podemos encontrar géneros que solo son diploides al igual que *Pachyrhizus* y otros géneros que presentan varios niveles de ploidía. Como se dijo en el párrafo anterior, las diferencias morfológicas (fenotípicas) existentes a nivel infraespecie no necesariamente son consecuencia de la poliploidía. Por ejemplo: Salazar (1997) evaluó los niveles de ploidía en 20 accesiones de Arracacha (*Arracacia xanthorrhiza* B.). Todos los individuos fueron tetraploides ($2n = 4x = 44$). Gaspar (1998) determinó los niveles de ploidía para Olluco (*Ullucus tuberosus* C.), Oca (*Oxalis tuberosa* M.) y Mashua (*Tropaeolum tuberosum* R. & P.). Evaluó 17 accesiones de Olluco que presentaban diferencias fenotípicas y todas resultaron ser diploides ($2n = 2x = 24$). En

Oca, evaluó 15 accesiones de las cuales cuatro fueron tetraploides ($2n = 4x = 32$), nueve fueron pentaploides ($2n = 5x = 40$), y dos fueron hexaploides ($2n = 6x = 48$). En Mashua, 13 accesiones fueron evaluadas de las cuales ocho fueron diploides ($2n = 2x = 26$) y cinco fueron triploides ($2n = 3x = 39$).

Masterson (1994) realizó un estudio donde relaciona el tamaño de los estomas en plantas fósiles y sus niveles de ploidía comparándolos con sus parientes actuales. Concluyó que aproximadamente el 70% de las angiospermas tienen números básicos mayores a los que tenían sus ancestros, indicando que estas han evolucionado por poliploidía. Stebbins (1950) reportó que si una especie determinada posee un número haploide $n \geq 12$, puede ser considerada dentro de aquellas que han evolucionado de esta manera. Sin embargo, no es el caso de este género pues la estabilidad observada en el número cromosómico nos indica que en su proceso evolutivo no ha habido anomalías del ciclo celular, por ejemplo formación de gametos no reducidos, ni cruces interespecíficos con parientes con otros niveles de ploidía que hayan podido generar poliploides (Ramsey y Schemske, 1998).

Lackey (1980) también encontró una alta estabilidad en el número cromosómico dentro de la tribu Phaseoleae. En su trabajo reporta el número cromosómico para 33 especies de la tribu encontrando que el número básico característico es de 10 u 11 y que la poliploidía no es común. Aunque, hasta entonces, el género era considerado dentro de la subtribu Diocleinae, luego, estudios moleculares y morfológicos (Doyle and Doyle, 1993; Lee y Hymowitz, 2001, Espert et al., 2008 and Kavanagh and Ferguson, 1981) han demostrado que este género corresponde a la subtribu Glycininae.

Estos resultados sugieren que la diversificación entre las tres especies de *Pachyrhizus* ha ocurrido a nivel de cambios polimórficos en el ADN, tipo mutaciones puntuales, de manera que la caracterización molecular daría mayor información acerca de las relaciones filogenéticas entre las tres especies.

4.2 CARACTERIZACIÓN MOLECULAR MEDIANTE MARCADORES AFLP

4.2.1 TAMIZADO DE INICIADORES

De las 52 combinaciones de iniciadores evaluadas se eligieron aquellas que presentaron el mayor porcentaje de fragmentos polimórficos, estos se muestran en el anexo 1. Las ocho combinaciones elegidas para el análisis de todos los individuos se muestran en el cuadro 4.

Cuadro 4. Combinaciones de iniciadores AFLP elegidas para el análisis de diversidad y agrupamiento de las accesiones de *Pachyrhizus*.

Combinación	EcoRI	Secuencia (5'-3')	MseI	Secuencia (5'-3')
1	E33	AAG-3	M61	CTG-3
2	E43	ATA-3	M37	ACG-3
3	E43	ATA-3	M40	AGC-3
4	E44	ATC-3	M42	AGT-3
5	E44	ATC-3	M61	CTG-3
6	E45	ATG-3	M36	ACC-3
7	E46	ATT-3	M48	CAC-3
8	E46	ATT-3	M54	CCT-3

En el tamizado también se determinó la cantidad necesaria de individuos por accesión a evaluar. Las primeras pruebas se realizaron con dos accesiones de cada especie y tres individuos por cada accesión. Al ver que el porcentaje de polimorfismo por accesión de las tres especies era bajo, menor a 10% para *P. ahipa* y *P. tuberosus* y menor al 30% para *P. erosus*, se optó por reducir el número de individuos a uno por accesión de *P. ahipa* y *P. tuberosus* y dos por accesión de *P. erosus* para las pruebas siguientes y el análisis final (anexo 3).

4.2.2 POLIMORFISMO Y DIVERSIDAD GENOTÍPICA

El análisis de las tres especies de *Pachyrhizus* a partir de las ocho combinaciones elegidas identificó en total 266 fragmentos de los cuales 181 fueron polimórficos (68%). En el cuadro 5 se presenta a manera de resumen el número de fragmentos polimórficos, fragmentos compartidos, porcentajes e índices de diversidad genotípica de Shannon (H_s) para cada especie y cada combinación de iniciadores.

Los índices de diversidad de Shannon promedio para cada especie fueron: 1.43 para *P. ahipa*, 1.31 para *P. tuberosus* y 2.49 para *P. erosus*, si se considera a todos los individuos analizados como un solo grupo se obtiene el índice de diversidad total, que en promedio es 2.85 (cuadro 5).

Cuadro 5. Número de fragmentos AFLP por combinación de iniciadores, índices de diversidad genotípica de Shannon (H_s) y comparación entre las tres especies cultivadas de *Pachyrhizus*.

Iniciadores	No. Fragmentos polimórficos						Índice de diversidad fenotípica (H_s)			Total (H_w)	
	Fragmentos totales	PA	PT	PE	Compartidos	Totales	% Fragmentos polimórficos	PA	PT		PE
E33/M61	58	14	10	31	1	40	69.0	1.20	1.47	2.73	2.89
E43/M37	21	5	5	11	2	16	76.2	1.50	1.75	2.58	3.00
E43/M40	23	5	3	7	0	12	52.2	1.17	1.28	2.10	2.41
E44/M42	42	8	10	17	2	27	64.3	1.87	1.96	2.55	3.17
E44/M61	25	6	3	11	2	18	72.0	1.92	1.00	2.62	3.08
E45/M36	32	7	5	8	0	21	65.6	1.01	0.96	1.92	2.39
E46/M48	30	6	1	13	0	20	66.7	0.97	0.60	2.65	2.62
E46/M54	35	7	5	17	1	27	77.1	1.78	1.47	2.80	3.20
Total	266	58	42	115	8	181					
Promedio	33.3	7.3	5.3	14.4	1.0	22.6		1.43	1.31	2.49	2.85
% Polimorfismo		21.8	15.8	43.2	3.0	68.0		0.50	0.46	0.88	

PA: *Pachyrhizus ahipa*, PT: *Pachyrhizus tuberosus*, PE: *Pachyrhizus erosus* y H_w : índice de diversidad total.

Se puede concluir que *P. erosus* es la especie que posee mayor diversidad genotípica, ya que en promedio y para cada combinación de iniciadores evaluados los índices de Shannon son mayores para esta especie. Sin embargo, no se puede afirmar entre *P. ahipa* y *P. tuberosus* cual es la especie de menor diversidad genotípica. A pesar que el índice de diversidad promedio para *P. ahipa* es mayor, los índices individuales para cada combinación de iniciadores indican que en cuatro combinaciones el índice de Shannon es mayor para *P. ahipa* y en las otras cuatro el índice es mayor para *P. tuberosus*. Por lo tanto no se podría asegurar que *P. ahipa*

posee una mayor diversidad que *P. tuberosus* a menos que se evalúe un mayor número de combinaciones de iniciadores y/o un mayor número de accesiones.

El estudio permitió hallar combinaciones de iniciadores que tendrían utilidad para discriminar a una especie en particular debido a que no comparten fragmentos polimórficos con las otras dos. Es el caso de *P. erosus* con E43/M40 y E45/M36 y de *P. tuberosus* con E46/M48.

4.2.3 ANÁLISIS GENÉTICO

Se construyó una matriz de similaridad a partir de los datos obtenidos con marcadores AFLP. Se evaluaron todos los individuos utilizando el índice de Jaccard y el método de agrupamiento de medias aritméticas no ponderadas, UPGMA. Se utilizó el programa NTSYS para construir la matriz y generar un dendrograma (figura 7).

La matriz construida muestra coeficientes de similaridad en el rango de 0.19 – 1.00. El rango de los coeficientes para la especie *P. ahipa* es de 0.60 - 1.00, para *P. tuberosus* es 0.67 - 0.96 y para *P. erosus* es 0.52 - 0.93. *P. ahipa* fue la única especie que presentó un índice de 1.00 entre diferentes accesiones, es decir, genotipos con una similaridad total o posibles duplicados como se puede observar en los grupos formados en el dendrograma por las accesiones CIP 209004 y CIP 209006, las accesiones CIP 209024, CIP 209026 y CIP 209027 y CIP209007 y CIP 209021 (figura 7). Los dos primeros grupos son originarios de Bolivia y en el tercer grupo la primera accesión es de Bolivia y la segunda es de Argentina.

El dendrograma generado a partir del agrupamiento UPGMA muestra dos grupos principales con un coeficiente de similaridad (J) de 0.28, el primero contiene a las accesiones correspondientes a *P. ahipa* y *P. tuberosus* (A) y el segundo está compuesto sólo por las accesiones de *P. erosus* (B). El grupo A contiene a *P. ahipa* y *P. tuberosus* en dos sub- grupos claramente separados.

P. erosus fue la única especie que necesitó que se evalué dos individuos por accesión debido a su alto nivel de polimorfismo (punto 4.2.1). Este parentesco se puede corroborar al observar que la similitud es más alta entre individuos de la misma accesión (figura 7). Como es el caso de las accesiones: CIP 209005, CIP 209016, CIP 209018, CIP 2090519, CIP 209052 y CIP 209053.

De la accesión CIP 209017 se evaluaron cuatro individuos debido a que existen dos fenotipos distintos dentro de la misma, 209017R (semillas rojas) y 209017P (semillas pardas). En el dendrograma se observa que los individuos con semillas rojas se agrupan entre ellos inicialmente y luego con el individuo de semillas pardas. El segundo individuo de semillas pardas se diferencia bastante de este grupo.

Dentro de las muestras a analizar se consideró una accesión de *P. tuberosus* CIP 209057, sin embargo, durante el estudio se observó que su patrón de fragmentos AFLP para cada combinación de iniciadores no era el correspondiente a las demás accesiones de *P. tuberosus* y se asemejaba más al patrón de *P. erosus* (figura 8). Esto se confirmó también mediante los análisis estadísticos donde esta accesión muestra coeficientes de similaridad mas altos con el grupo de *P. erosus* (figura 7) por esta razón no se consideró a esta accesión para hallar los índices de diversidad de Shannon ni para el análisis de AMOVA detallado posteriormente.

Figura 7. Dendrograma generado por agrupamiento no ponderado por pares utilizando la media aritmética (UPGMA). PA: *Pachyrhizus ahipa*, PT: *Pachyrhizus tuberosus*, PE: *Pachyrhizus erosus*. p:fenotipo de semillas pardas r:fenotipo de semillas rojas.

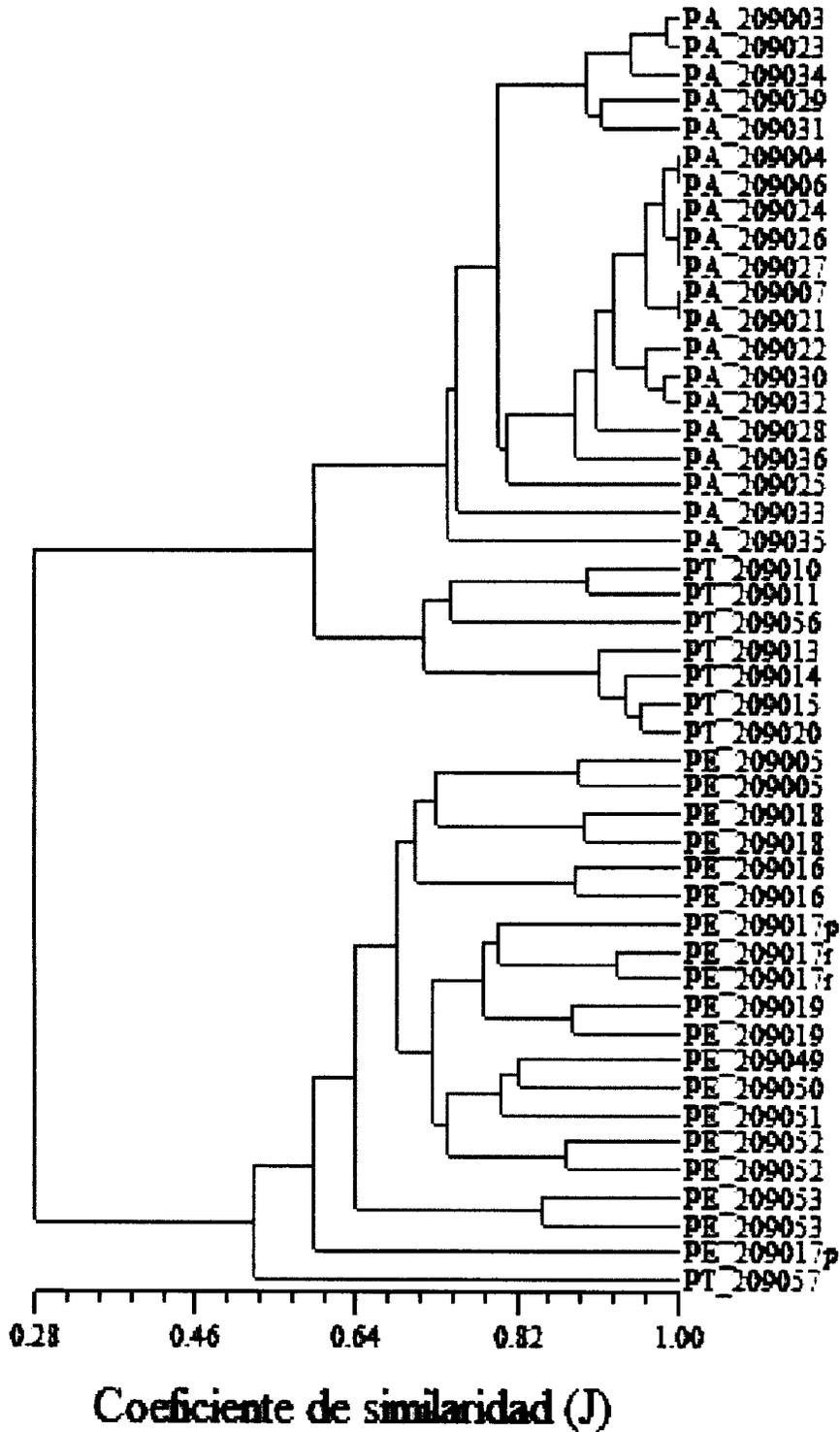
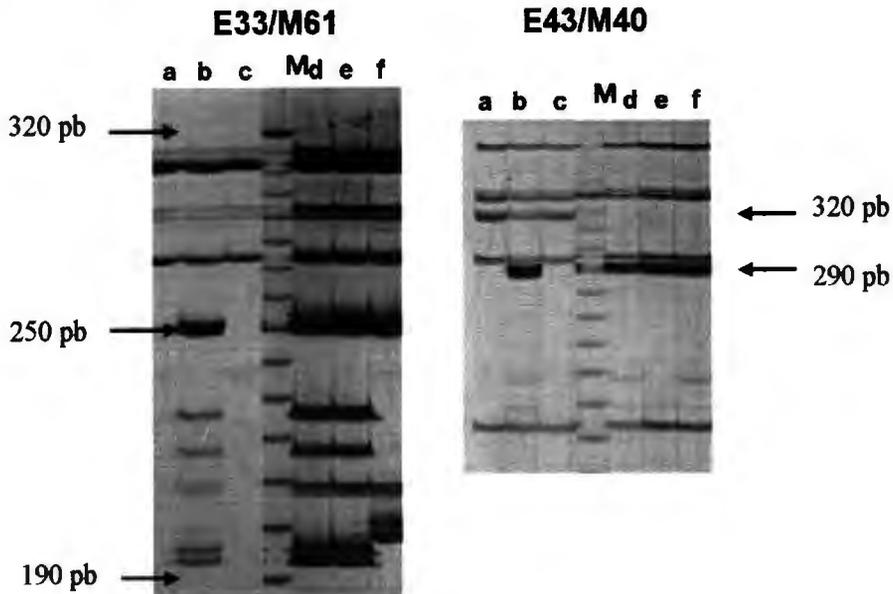


Figura 8. Patrón AFLP de dos combinaciones elegidas de iniciadores mostrando al individuo CIP 209057 (b) flanqueado por dos individuos *P. tuberosus* (a y c) y comparado con tres individuos de *P. erosus* (d, e y f). M: marcador de peso.



4.2.4 ANÁLISIS DE COORDENADAS PRINCIPALES (PCoA)

El análisis se realizó a partir de la matriz de similitud construida anteriormente en el punto 4.2.3. Se utilizó el programa DARwin 5 para generar un gráfico de distribución de las tres especies mediante un análisis de coordenadas principales.

En la figura 9 se muestran todas las accesiones evaluadas en este estudio, las tres especies cultivadas de *Pachyrhizus* (*P. ahipa* de color azul, *P. tuberosus* de color verde y *P. erosus* de color rojo) y los híbridos *P. ahipa* x *P. tuberosus* que se presentan de color negro. La elección de los ejes de las coordenadas fue según el porcentaje de variación que representaban. El eje “x” representa el 59.47 % y el eje “y” representa el 9.63 % de la variabilidad, el porcentaje acumulado que se muestra en la figura 9 sería el 69.1% de la variación total.

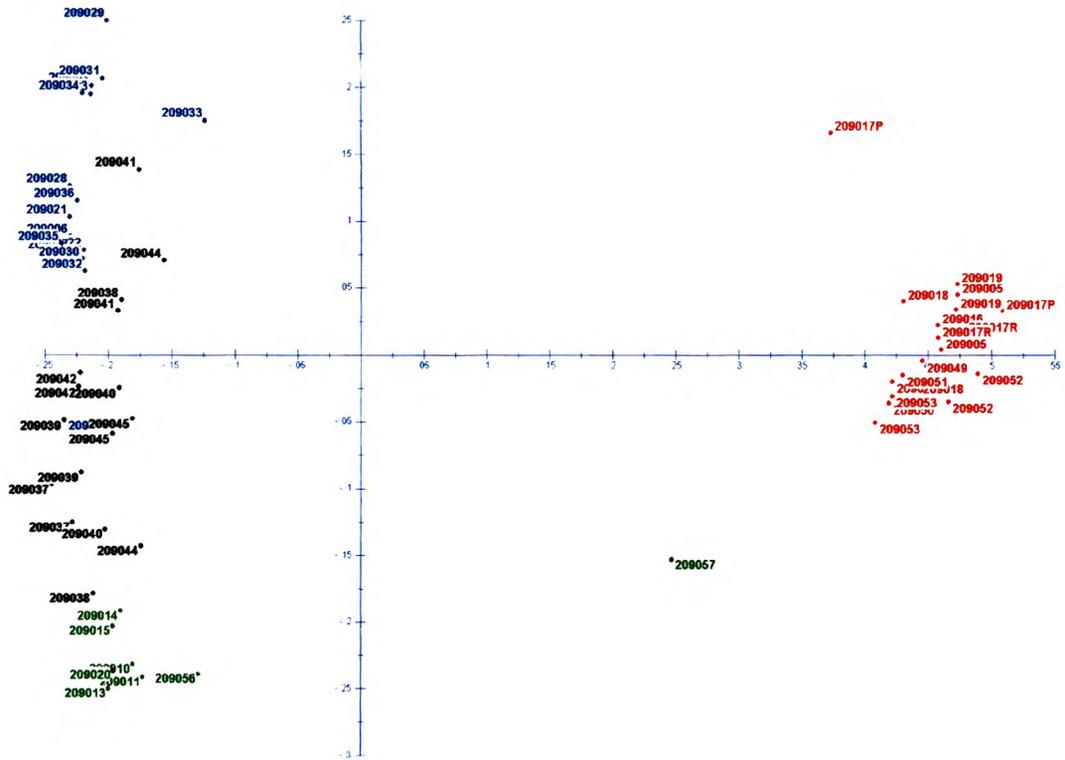
Al igual que en el dendrograma (figura 7), se puede observar que el grupo más diferenciado está compuesto por las accesiones de *P. erosus*. Los más relacionados son *P. ahipa* y *P. tuberosus*. También se puede ver como se distribuyen los híbridos a lo largo del espacio entre estos dos grupos.

Se puede observar dos individuos alejados de sus grupos, el primero pertenece a la accesión CIP 209057 *P. tuberosus* que, como se indica en el punto anterior, se agrupa mejor con *P. erosus*. Sin embargo, si se le considera dentro este grupo, es la accesión que presenta los coeficientes de similaridad más bajos con respecto a las demás accesiones (0.47-0.59).

El segundo individuo pertenece a la accesión CIP 209017, en la figura 9 se puede observar que tres individuos, dos de semillas rojizas y uno de semillas pardas están evidentemente incluidos dentro del grupo de *P. erosus* y una accesión de semillas pardas se ve alejada de este. Esta misma observación se verifica en el dendrograma (figura 7).

En el análisis PCoA realizado por especie se puede observar que los dos grupos formados en el dendrograma (figura 7) para *P. ahipa* no se distinguen claramente y las accesiones argentinas están ampliamente distribuidas con presencia en ambos grupos (anexo 3). Esto indicaría que la especie no presenta mucha variación con respecto al lugar de origen además de la posibilidad de encontrar fenotipos duplicados en Bolivia y Argentina (Punto 4.2.3). En el caso de *P. tuberosus* si se distinguen los grupos cultivares Chuin y Ashipa (anexo 4), también es evidente la separación de la accesión CIP 209057 con el resto de accesiones.

Figura 9. Análisis de coordenadas principales de las especies de *Pachyrhizus* incluyendo los híbridos *P. ahipa* x *P. tuberosus*. *P. erosus* (rojo), *P. ahipa* (azul), *P. tuberosus* (verde) e Híbridos (negro).



4.2.5 ANÁLISIS DE VARIANZA MOLECULAR (AMOVA)

Se realizaron dos AMOVA, uno para las tres especies de *Pachyrhizus* y otro entre las variedades de *P. tuberosus*.

El análisis para las tres especies de *Pachyrhizus* revela que la variación total de los resultados se explica en un 72.26% por la variación molecular que existe entre las especies. La variación dentro de cada especie, es decir entre los individuos de cada grupo, explica un 27.73% de la variación total (Cuadro 6).

Cuadro 6. Resultados del AMOVA para las tres especies de *Pachyrhizus* (cuadro generado por el programa Arlequin 3.5.1.2, modificado en Excel)

AMOVA diseño y resultados		
Fuentes de variación	Grados de Libertad	Porcentaje de variación
Entre especies	2	72.26
Entre accesiones dentro de una especie	43	27.74
Total	45	

Inicialmente se había tomado en cuenta a la accesión *P. tuberosus* CIP 209057 dentro del AMOVA, el resultado mostró un incremento en el porcentaje de variación que es explicado por los individuos dentro de una especie, 30.23%. Y disminuyó aquella que es explicada por la variación entre especies, 69.77%. Por lo tanto, se prefirió no considerar a esta accesión pues sus valores afectan significativamente los porcentajes de variación, además de las dudas existentes respecto a su identidad.

Se realizó un segundo AMOVA para los individuos de *P. tuberosus*, debido a la existencia de distintos cultivares dentro de esta especie como chuín, ashípa, yushpe y jíquima. No se consideró a la accesión CIP 209057.

Según el dendrograma, de las muestras evaluadas de *P. tuberosus* se distinguen dos grupos, uno compuesto por las accesiones CIP 209010, CIP 209011 y CIP 209056 y el otro compuesto por las accesiones reportadas como chuín, CIP 209013, CIP 209014, CIP 209015 y CIP 209020 (Sørensen, 1996 y Tapia, 1998). Los resultados del AMOVA indican que la variación molecular entre cultivares explica el 57.58% de la variación total mientras que la variación entre los individuos dentro de los cultivares explica el 42.42% (cuadro 7)

Cuadro 7. Resultados del AMOVA para los individuos de *P. tuberosus* (cuadro generado por el programa Arlequin 3.5.1.2, modificado en Excel)

AMOVA diseño y resultados		
Fuentes de variación	Grados de Libertad	Porcentaje de variación
Entre cultivares	1	57.58
Entre accesiones dentro de un cultivar	5	42.42
Total	6	

Sin embargo, en el dendrograma se puede observar que existe una mayor similitud entre las accesiones CIP 209010 y CIP 209011, incluso ambas están reportadas como Ashipa. Mientras que para la accesión CIP 209056 se desconoce a que cultivar podría pertenecer. Si no se le considera dentro del análisis AMOVA los resultados son los siguientes (cuadro 8).

Cuadro 8. Resultados del AMOVA para los individuos de *P. tuberosus* sin la accesión CIP 209056 (cuadro generado por el programa Arlequin 3.5.1.2, modificado en Excel)

AMOVA diseño y resultados		
Fuentes de variación	Grados de Libertad	Porcentaje de variación
Entre cultivares	1	75.10
Entre accesiones dentro de un cultivar	4	24.90
Total	5	

El mayor porcentaje de variación total sigue siendo explicado por la variación molecular entre cultivares pero con un incremento a 75.10%. Esto indica que la accesión CIP 209256 podría ser considerada como un cultivar diferente a “Ashipa” y “Chuin” aunque serían necesarios estudios morfológicos para dar una conclusión determinante y sería recomendable incrementar el número de accesiones de esta especie en el Banco de Germoplasma para disponer de una mayor muestra para el análisis.

Hasta el momento los únicos estudios moleculares en este género se han realizado mediante marcadores del tipo RAPDs (Estrella et al., 1998; Tapia, 1998 y Tapia y Sørensen, 2003). En el trabajo realizado por Estrella et al. (1998) se analizaron 65 accesiones pertenecientes a las especies *P. erosus*, *P. tuberosus*, *P. ferrugineus* y *P. panamensis*. Solo dos de esas accesiones *P. erosus* CIP 209016 y CIP 209017 también estuvieron dentro de la muestra analizada en este trabajo.

El análisis genético de Estrella et al. (1998) logra 14 grupos en los cuales se diferencia claramente la especie *P. erosus* de *P. tuberosus* (y dentro de esta última se diferencian los cultivares Jíquima y Ashipa). También se logra distinguir que los grupos correspondientes a accesiones cultivadas de *P. erosus* se diferencian por el origen de las accesiones, habiendo grupos compuestos en su mayoría por accesiones de origen Mexicano, de origen Centroamericano y de origen Oriental.

De igual forma, en este trabajo se aprecia la diferencia en agrupamiento de las especies *P. tuberosus* y *P. erosus* (figura 7). Con respecto a los orígenes de las accesiones de *P. erosus* y los grupos formados podemos ver que las accesiones Mexicanas (CIP 209019, CIP 209049 y CIP 209051) se encuentran en un solo grupo junto con una accesión de Brasil (CIP 209017) y una de Tonga (CIP 209052); en un segundo grupo están una accesión de Brasil (CIP 209005), una de China (CIP 209018) y una de Guatemala (CIP 209016). Como grupos aislados está una accesión de Tonga (CIP 209053) y un fenotipo de la accesión CIP 209017 (figura 7 y anexo 5).

Como estas especies son originarias de Centroamérica, es de esperarse que las accesiones pertenecientes a estos lugares tiendan a formar un solo grupo en ambos estudios. También se puede notar que los grupos formados por accesiones introducidas en otros países, como el caso de la CIP 209018 de China, forman grupos con alguna accesión de Centroamérica, como la CIP 209016 de Guatemala, las características compartidas con esta accesión indicarían que esta accesión derivó de una introducción de este país.

Con respecto al complejo *P. tuberosus*, Tapia (1998) realizó un estudio de caracterización morfológica y molecular de las entradas pertenecientes al banco de germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Morfológicamente logró distinguir cuatro grupos: dos correspondientes a Ashipa, Chuin y Jíquima y los caracteres cualitativos que mejor distinguían entre las variedades fueron la forma y tipo de foliolo central, color de pulpa de la raíz y forma de la semilla. Entre los caracteres cuantitativos que mejor discriminaban los grupos fueron el número de días a la floración, número de días a la madurez de la legumbre, la relación largo/ancho (L/A) del foliolo principal y ancho de la vaina. También detectaron cuatro accesiones que no concordaban con el grupo clasificado y el nombre de la etiqueta: TC352, etiquetada como Chuin y agrupada como Ashipa; TC550 etiquetada como Jíquima y agrupada como Ashipa; TC553 etiquetada como Jíquima y agrupada como Ashipa y TC538 etiquetada como Ashipa y agrupada como Jíquima.

En la fase molecular del estudio de Tapia (1998) se ratifican los tres grupos descritos por Sørensen (1996): Ashipa, Chuin y Jíquima y también se detectaron los errores de etiquetado en tres de las cuatro accesiones mencionadas en el párrafo anterior: TC352, TC550 y TC538. En esta fase también se formó un cuarto grupo con dos accesiones que morfológicamente se clasificaron como “Ashipa (grupo 1)”, TC 118 y TC 525, pero molecularmente eran las más distanciadas del grupo y se sospecha que pudieran tratarse de híbridos de *P. tuberosus* con *P. erosus* producto de cruzamientos realizados por Sørensen (comunicación personal, Tapia, 1998).

De manera similar la accesión CIP 209057 esta etiquetada como *P. tuberosus* y ha presentado un comportamiento diferente durante este estudio. En un comienzo era evidente la diferencia en el patrón de fragmentos que mostraba esta accesión con los demás de la misma especie en los geles para cada combinación de iniciadores (figura 8). Posteriormente esta accesión presentó el menor índice de similaridad con las demás accesiones de la especie y por ende es la más alejada en el dendrograma (figura 7), y finalmente en el análisis de coordenadas principales se puede observar que esta accesión se sitúa entre los grupos *P. tuberosus* y *P. erosus* (figura 9). Mediante una comunicación personal con Sørensen, comentó que esta accesión podría pertenecer a aquellas producto de las cruces *P. tuberosus* x *P. erosus*, sobre todo teniendo en cuenta que las semillas de esta accesión mantenidas en el banco de germoplasma del CIP provienen del CATIE.

Lamentablemente no se cuenta con el número de colector de la accesión CIP 209057, y dentro de la colección no figuran las accesiones mal clasificadas citadas por Tapia (1998). Sin embargo las accesiones que han sido evaluadas tanto en esta tesis como en el estudio de Tapia (1998) no están mal clasificadas y se agrupan dentro del grupo Chuin (CIP 209013, CIP 209015 y CIP 209020).

Con respecto a las ventajas técnicas del uso de AFLPs en esta tesis, se pudo comprobar que si bien es mas laboriosa que RAPDs, ambos marcadores son dominantes, el número de fragmentos polimórficos generados con AFLPs es mucho mayor y por lo tanto la cantidad de información para discriminar también. En el estudio de Estrella et al. (1998) se utilizaron 6 iniciadores decámeros que generaron 51 fragmentos en total y en promedio 25 fragmentos polimórficos, en el estudio de Tapia (1998) se utilizaron 10 iniciadores que generaron en total 97 fragmentos y 32 fragmentos polimórficos. En esta investigación se utilizaron ocho combinaciones de iniciadores que generaron 266 fragmentos en total y 181 fragmentos polimórficos. Además, la reproducibilidad de la técnica RAPDs no es totalmente satisfactoria (Jones et al. 1997, Wilson et al. 2004). Sin embargo, no es determinante la superioridad de una técnica sobre otra, pues los

porcentajes de polimorfismo pueden variar dependiendo del cultivo a evaluar, por ejemplo, Narváez et al. (2000) utilizó RAPDs y AFLPs para el análisis de vides (*Vitis vinifera*) obteniendo el mismo porcentaje de polimorfismo para ambas técnicas.

Los marcadores moleculares del tipo AFLP han sido exitosamente utilizados con especies parientes: de la misma subtribu, Glycininae, como la soja *Glycine max* y su pariente ancestral *Glycine soja* para determinar relación genética y diversidad de las especies (Maughan et al. 1996). Con 15 combinaciones de iniciadores lograron 759 fragmentos de los cuales 274 eran polimórficos en 23 accesiones entre soja cultivada y silvestre, esta última albergaba una mayor diversidad genética con un índice de diversidad (Hs) promedio de 2.32 de un total de 2.89. Mientras que en el análisis de agrupamiento ambas especies se distinguían muy bien y las líneas cultivadas de soja pertenecían a un estrecho grupo. También comprobaron que estos marcadores segregaban de una manera mendeliana.

Otras especies importantes dentro de la familia son aquellas del género *Phaseolus* y *Vigna*, ambas de la subtribu Phaseolinae. Para el caso del pajarito, *Phaseolus lunatus*, Caicedo et al. (1999) utilizó marcadores AFLP para establecer relaciones entre la especie silvestre y parientes de América del Sur, *P. augusti*, *P. bolivinus*, *P. pachyrrhizoides* y *P. rosei*, donde establecieron tres grupos que se diferenciaban más geográficamente que por su identidad taxonómica. Coulibaly et al. (2002) realizaron un estudio en *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* vulgarmente conocida como frijol Castilla. Evaluaron especies cultivadas (var. *unguiculata*), silvestres anuales (var. *spontanea*) y silvestres perennes (ssp. *pubescens*, ssp. *tenuis* y ssp. *alba*) para determinar la variación genética, índices de diversidad y flujo genético dentro del continente de origen, África. Lograron determinar que el flujo de genes a partir de la especie silvestre *V. unguiculata* ssp. *unguiculata* var. *spontanea* sucedió de la parte este de África y se expandió al sur y oeste más no se pudo determinar si la especie cultivada se originó en el oeste o norte de África.

Los marcadores AFLPs se han utilizado también en otros cultivos del rubro RTAs como el yacón, *Smallanthus sonchifolius*, en el cual seis combinaciones de iniciadores lograron 84 bandas polimórficas con un porcentaje de polimorfismo de 23.4. Para el mismo análisis con RAPDs obtuvieron en promedio un 28.7 por ciento de polimorfismo con 61 iniciadores (Milella et al., 2011). En arracacha, *Arracacia xanthorrhiza*, analizaron 334 accesiones con cinco combinaciones de iniciadores para obtener 148 bandas polimórficas, en total un 71 por ciento de polimorfismo (Biondi et al., 2009). Para oca, *Oxalis tuberosa*, se utilizaron siete combinaciones de iniciadores con un 82 por ciento de polimorfismo total (Biondi, 2006) para el mismo cultivo y las mismas combinaciones Adrianzen (2007) obtuvo un 82.39 por ciento de polimorfismo.

El uso de marcadores AFLPs es pues una técnica que genera gran cantidad de información para establecer las relaciones filogenéticas, análisis de diversidad y estudios geográficos. Para la caracterización molecular de las especies de *Pachyrhizus* logró discriminar las tres especies y sus híbridos, logró detectar duplicados dentro de la especie *P. ahipa* como el caso de las accesiones CIP 209004, CIP 209006, CIP 209024, CIP 209026, CIP 209027, CIP209007 y CIP 209021, permitió distinguir entre las variedades dentro del complejo *P. tuberosus* y a su vez pudimos identificar una accesión mal clasificada. Esto es de vital importancia para el manejo eficiente de un banco de germoplasma. Este estudio también contribuye al manejo de la colección de *Pachyrhizus* al dar un alcance de la diversidad contenida en cada especie. Es importante saber que las especies con mayor diversidad genotípica son *P. erosus* y *P. tuberosus*. Esta última debido a las cuatro cultivares que componen el complejo, para el caso de Ashipa y Chuin la variación total es explicada en un 75.10% por la variación entre los cultivares.

Actualmente la colección de *Pachyrhizus* del CIP cuenta con 94 accesiones y es pequeña como para formar una colección núcleo considerando que estas llegan a almacenar hasta 3000 accesiones. Por ejemplo, la colección núcleo de *Sorghum* mantenida en el Instituto Internacional de Investigación de Cultivos para los Trópicos Semiáridos (ICRISAT) es de 3475 accesiones de un total de 33100. Para garbanzo es de 1956

accesiones de un total de 16991 (Upadhyaya y Gowda, 2009). Para el caso del CIP, se desarrolló una colección núcleo de las accesiones peruanas de camote cultivado (*Ipomoea batatas*), de un total de 1939 accesiones se eliminaron duplicados y se redujo a 673 accesiones únicas (Huamán et al. 1999). Similarmente para papa cultivada, compuesta en un 75% por *Solanum tuberosum* subsp. *andigena*, se redujo el número de accesiones de 10722 a 306. Ambos estudios se basan en morfología, geografía y reacción a enfermedades y plagas (Huamán et al., 2000).

A medida que se incremente el número de accesiones de la colección de *Pachyrhizus* sería recomendable hacer estudios moleculares relacionados con estudios morfológicos de varios individuos por accesión. De esta manera se podría determinar que accesiones contienen una mayor diversidad genética y serían posibles entradas para una posterior colección núcleo.

V. CONCLUSIONES

1. Todos los individuos analizados de las tres especies cultivadas de *Pachyrhizus* fueron diploides ($2n= 2x = 22$) con un número básico igual a 11 ($x= 11$). Este número básico es bastante estable y característico entre las especies de la tribu Phaseoleae.
2. Los parámetros más importantes para determinar la hora de colecta de raíces son la temperatura y la humedad relativa del ambiente. Para garantizar una alta frecuencia de metafases, la colecta de raíces de *Pachyrhizus* se debe realizar a 25°C con una humedad relativa del 65%, dependiendo de la estación estas condiciones se pueden dar entre las 9:00am y las 14:00pm.
3. A partir de los índices de diversidad genotípica (H_s) se concluye que *P. erosus* es la especie que posee mayor diversidad ($H_s = 2.49$). Sin embargo, no se puede afirmar qué especie, *P. ahipa* ($H_s = 1.43$) o *P. tuberosus* ($H_s = 1.31$), es más diversa. El índice de diversidad promedio para *P. ahipa* es ligeramente mayor, sin embargo para asegurar que *P. ahipa* posee una mayor diversidad que *P. tuberosus* sería necesario evaluar un mayor número de combinaciones de iniciadores y/o un mayor número de accesiones.
4. La matriz de similaridad muestra dos grupos principales con un coeficiente de similaridad de Jaccard de 0.28, el primero contiene a las accesiones correspondientes a *P. ahipa* y *P. tuberosus* y el segundo grupo está compuesto solo por las accesiones de *P. erosus*. El primer grupo contiene a *P. ahipa* y *P. tuberosus* en dos sub- grupos claramente separados. De manera que estas últimas dos especies están más emparentadas y diversificaron a partir del mismo ancestro.
5. El análisis AMOVA para *Pachyrhizus* reveló que la diferenciación es mayor entre las tres especies. La variación total de los resultados se explica en un 72.26 por ciento por la variación molecular que existe entre las especies. La variación dentro de cada especie, es decir entre los individuos de cada grupo, explica un 27.73 por ciento de la variación total.

También se realizó un AMOVA para los cultivares Chuin y Ashipa dentro de *P. tuberosus* la variación total sigue siendo explicada por la variación molecular entre cultivares, que fue de 75.10 por ciento.

6. El uso de marcadores AFLP permitió: a) discriminar las tres especies de *Pachyrhizus* y sus híbridos; b) detectar duplicados dentro de la especie *P. ahipa* como el caso de las accesiones CIP 209004, CIP 209006, CIP 209024, CIP 209026, CIP 209027, CIP209007 y CIP 209021; c) distinguir entre los cultivares dentro del complejo *P. tuberosus* y d) identificar una accesión mal clasificada, CIP 209057. Esto es de vital importancia para el manejo eficiente de un banco de germoplasma.

VI. RECOMENDACIONES

Los resultados de esta tesis podrían complementarse más adelante con un análisis más detallado de cada accesión de la colección. Estos análisis podrían contener estudios moleculares morfológicos. Los estudios moleculares podrían evaluar una mayor cantidad de combinaciones de iniciadores que puedan dar mayor información.

Al contar con una muestra más amplia se podrían evaluar las diferencias con respecto al lugar de origen y los índices de diversidad por accesión.

Con respecto a los análisis de ploidía y la estabilidad observada se podría prescindir de realizar los conteos en muestras más amplias. Si aun así se desea realizar un tamizado de la ploidía de las accesiones se podría intentar realizarlo mediante citometría de flujo y complementarlo con la cuantificación de ADN total por cada núcleo pues esta característica es distintiva de cada especie.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adrianzen J., PM. 2007. Análisis de la diversidad genética de ocas cultivadas (*Oxalis tuberosa* mol.) de cuatro comunidades campesinas del cuzco usando AFLP. Tesis Mag. Sci. Lima, PE. UNALM. 124 p.

Annerose, DJM y Diouf, O. 1994. Some aspects of response to drought in the genus *Pachyrhizus* Rich. ex DC. Proceedings of the first. international symposium on tuberous legumes. Guadeloupe, FWI. p. 199–214

Biondi T., JA. 2006. Análisis de la diversidad genética de la colección de *Oxalis tuberosa* Molina “oca” mantenida en el Centro Internacional de la Papa, usando marcadores AFLP. Tesis Lic. Biol. Lima, PE. URP. 78 p.

Biondi, J; Zorrilla, C; Manrique, I; Arbizu, C; Roca, W; Medina, T; Seminario, J; Quispe, J; Tay, D y Blás, R. 2009. Genetic diversity of arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) in Peru. 15th Triennial ISTRC Symposium p 60-66

Brown, AHD. 1995. The core collection at the crossroads. En: Core collections of plant genetic resources. Roma, It. p. 3-19

Caicedo, AL; Gaitan E; Duque, MC; Toro Chica, O; Debouck, DG y Tohme, J. 1999. AFLP fingerprinting of *Phaseolus lunatus* L. and related wild species from South America. Crop Science. 39:1497-1507

CIP (Centro Internacional de la Papa, PER). 1998. Raíces y tubérculos andinos: informe sobre la colaboración en investigaciones de biodiversidad, 1993-97. Trad. MA Galindo. Lima, PER. 27 p.

Coulibaly, S; Pasquet, RS; Papa, R y Gepts, P. 2002. AFLP analysis of the phenetic organization and genetic diversity of *Vigna unguiculata* L. Walp. reveals extensive gene flow between wild and domesticated types. *Theoretical and applied genetics*. 104:358-366

Dalirsefat, SB; Meyer, AS y Mirhoseini, SZ. 2007. Comparison of similarity coefficients used for cluster analysis with amplified fragment length polymorphism markers in the silkworm, *Bombyx mori*. *Journal of insect science*. 9: 71

Doyle, JJ y Doyle, JL. 1993. Chloroplast DNA phylogeny of the Papilionoid legume tribe Phaseoleae. *Systematic botany*. 18(2): 309-327.

Espert, SM; Sede, SM; Ruiz, LK.; Fortunato, RH y Poggio, L. 2008. New chromosome reports in the subtribes Diocleinae and Glycininae (Phaseoleae: Papilionoideae: Fabaceae). *Botanical journal of the linnean society*. 158: 336-341.

Estrella, J.; Phillips, S.; Abbott, R.; Gillies, A. y Sørensen, M. 1998. Genetic Variation and Relationships in Agronomically Important Species of Yam Bean (*Pachyrhizus* DC.) Based on RAPD Markers. In: *Proceedings of the Second International Symposium on Tuberous Legumes, Celaya – Mexico*.

Excoffier, L. G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47-50.

Fassola, HE; Pachas, AN; Rohastch P; Uset A y Wiss F. 2007. *Pachyrhizus ahipa*: un cultivo alternativo para la obtención de proteínas y almidones: Informe campañas 2004- 2005 y 2005-2006. Montecarlo, Misiones Argentina. (INTA). 17 p.

Frankel, OH. 1984. Genetic perspective of germplasm conservation. En *Genetic Manipulations: Impact on man and society*. Arber, WK; Llimensee, K; Peacock, WJ y Starlinger, P eds. Cambridge: Cambridge University Press. p 161-170

Gaspar, S. 1998. Caracterización morfológica y nivel de ploidía en cultivares de Oca (*Oxalis tuberosa* M.), Papalisa (*Ullucus tuberosus* C.) e Isaño (*Tropaeolum tuberosum* R. & P.). Tesis título de Ing. Agr. Cochabamba, BOL. UMSS 122 p.

Ghislain, M; Zhang, DP y .Herrera, MR. 1999. Molecular biology laboratory protocols: plant genotyping. CIP eds. Lima, Perú. 38p.

Hancock, JF. 2003. Plant evolution and the origin of crop species. 2 ed. CABI publishing. Londres, UK. 313p.

Heider, B; Tumwegamire, S; Tukamuhabwa, P; Ndirigwe, J; Bouwe, G; Bararyenya, A; Hell, K; Lecrercq, J; Lautié, E; Wassens, R; Burgos, G; Zum, T; Thiele, G y Grüneberg, W. 2011. Nutritional improvement of yam bean and sustainability of farming systems in Central and West Africa. African crop science conference proceedings 10: 91-93

Hermann, M y Heller, J. eds. 1997. Andean roots and tubers: Ahipa, arracacha, maca and yacon. Roma, IT. IPGRI. 256 p.

Hilu, K. 1993. Polyploidy and the evolution of domesticated plants. American Journal of Botany 80(12): 1494-1499

Huamán, Z; Aguilar, C y Ortiz, R 1999. Selecting a Peruvian sweetpotato core collection on the basis of morphological, eco-geographical, and disease and pest reaction data. Theoretical and applied genetics. 98: 840- 844

Huamán, Z; Ortiz, R y Gómez, R. 2000. Selecting a *Solanum tuberosum* subs. *andigena* core collection using morphological, geographical, disease and pest descriptors. American journal of potato research. 77: 183-190

Jain, SM y Brar, DS. 2010. Molecular techniques in crop improvement. 2 ed. Springer. Londres, UK. 772p.

Jones, CJ; Edwards, KJ; Castaglione, S; Winfield, MO; Sala, F; Van de Wiel, C; Bredemeijer, G; Vosman, B; Matthes, M; Daly, A; Brettschneider, R; Bettini, P; Buiatti, M; Maestri, E; Malcevski, A; Marmiroli, N; Aert, R; Volckaert, G; Rueda, J; Linancero, R; Vazquez, A y Karp, A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. *Molecular breeding* 3: 381- 390

Kavanagh, TA y Ferguson, IK. 1981. Pollen morphology and taxonomy of the subtribe Diocleinae (Leguminosae: Papilionoideae: Phaseoleae). *Review of Palaeobotany and Palynology* 32: 317- 367

Kosman, E y Leonard, KJ. 2005. Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular ecology* 14: 415- 424

Lacadena, RJ. 1996. Citogenética: aplicaciones de la citogenética en la mejora de plantas. Madrid, ES. Complutense. 931 p.

Lackey, J. 1980. Chromosome numbers in the Phaseoleae (Fabaceae: Faboideae) and their relation to taxonomy. *American Journal Of Botany* 67(4): 595- 602

Lee, J. y Hymowitz, T. 2001. A molecular phylogenetic study of the subtribe Glycininae (Leguminosae) derived from the chloroplast DNA *RPS16* intron sequences. *American Journal of Botany* 88(11): 2064-2073

Martín, I. 2001. Conservación de recursos fitogenéticos. Hojas divulgadoras – Ministerio de agricultura, pesca y alimentación. Madrid, ES. 28 p

Masterson, J. 1994. Stomatal size in fossil plants – evidence for polyploidy in the majority of angiosperms. *Science* 264: 421–424

Maughan, PJ; Saghai Maroof, MA; Buss, GR y Huestis, GM. 1996. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) in soybean: species diversity, inheritance, and near- isogenic line analysis. *Theoretical and applied genetics*. 93: 392-401

Milella, L; Martelli, G; Salava, J; Fernández, E; Ovesná, J y Greco, I. 2011. Total phenolic content, RAPDs, AFLPs and morphological traits for the analysis of variability in *Smallanthus sonchifolius*. *Genetic resources and crop evolution*. 58: 545-551

Mueller, UG y Wolfenbarger LL. 1999. AFLP genotyping and fingerprinting. *Trends in ecology and evolution*. 14(10): 389-394

Narváz R., C; Valenzuela B., J.; Muñoz Sch., C. y Hinrichsen R., P. 2000. Comparación de RAPD y AFLP como métodos de identificación genética de vid basados en el estudio de fragmentos genómicos anónimos. *Agricultura técnica (Chile)*. 60(4): 320-340

Oré B., I; Delgado V., O; Mejía C., K; Sørensen, M y Kvist, PL. 2005. El cultivo de chuín: una alternativa para la seguridad alimentaria y la recuperación de suelos degradados en la amazonía peruana. Instituto de investigaciones de la amazonía peruana. Iquitos-Perú. 40p

Oré B., I; Sørensen, M; Kvist, PL y Delgado V., O. 2007. Review of the *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. Cultivar groups in Peru. *Plant genetic resources newsletter*. 151: 2-13

Orjeda F., MG. 1990. Desarrollo y Uso de Híbridos Interspecíficos entre *Ipomoea batatas* Lam. ($2n=6x=90$) e *I. trifida* (H.B.K.) G. Don. ($2n=2x=30$) como Probadores de Especies Silvestres Diploides y Tetraploides. Tesis Lic. Biol. Lima, PE. UNALM. 195 p.

Ørting, B.; Grüneberg, WJ y Sørensen, M. 1996. Ahipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi) in Bolivia. Genetic resources and crop evolution. 43: 435- 446

Ørting, B.; Grüneberg, WJ; Grau, A. y Sørensen, M. 1998. Status of Ahipa (*Pachyrhizus ahipa* (Wedd.) Parodi) in Bolivia and Northwestern Argentina. Proceedings of second. international symposium on tuberous legumes. Guanajuato, Mex. p. 73- 93

Pedersen, FS. 2004. Yield performance of Yam Bean (*Pachyrhizus* DC.) in Madagascar. Copenhagen, DEN. The Royal Veterinary and Agricultural University of Copenhagen (KVL). 16 p.

Perrier, X; Flori, A y Bonnot, F. 2003. Data analysis methods. En: Hamon, P., Seguin, M., Perrier, X. ,Glaszmann, J. C. Ed., Genetic diversity of cultivated tropical plants. Enfield, Science Publishers. Montpellier.pp 43 - 76.

Pressey, R. 1993. Cell wall composition and enzymes of Potatoes, Jicamas and Chinese water chestnuts. Journal of Food Biochemistry 17: 85-95

Ramsey, J y Schemske, DW. 1998. Pathways, mechanisms, and rates of polyploid formation in flowering plants. Annual Review of Ecology and Systematics 29: 467- 501.

Ratanadilok, N; Suriyawan, K y Thanaisawanayangjura, S. 1996. Yam Bean (*Pachyrhizus erosus* (L.) Urban) and its economic potential. Proceedings of second. international symposium on tuberous legumes. Guanajuato, MEX. p. 261- 273

Rohlf, FJ. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System, ver. 2.10p. Exeter Publishing, NY, USA.

Salazar, CA. 1997. Evaluación y caracterización citogenética de veinte entradas ecuatorianas de zanahoria blanca (*Arracacia xanthorrhiza* Bancroft.). Universidad Central de Ecuador (UCE). Pichincha, ECU. 159 p

Simpson, MG. 2006. Plant systematics. Elsevier academic press. London, UK. 578 p

Singh, RJ. 2002. Plant cytogenetics. 2 ed. CRC Press. Boca Ratón, Florida, USA. 463 p.

Sharma, AK y Sharma, A. 1980. Chromosome techniques. 3 ed. Butterworth & Co. Londres, Reino Unido. 711 p.

Sørensen, M. 1988. A taxonomic revision of the genus *Pachyrhizus* (Fabaceae – Phaseoleae). Nordic Journal of Botany. 8(2):167-192.

Sørensen, M. 1996. Yam bean (*Pachyrhizus* DC.). Promoting the conservation and use of underutilized and neglected crops. 2. IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute). Rome, It. 141 p

Spooner, D; van Treuren, R y de Vicente, MC. 2005. Molecular markers for genebank management. IPGRI technical bulletin No. 10. 126 p.

Stebbins, G. 1950. Variations and Evolution in Plants. Columbia University Press, New York.

Tanksley, SD y McCouch, SR. 1997. Seed banks and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild. Science 277: 1063-1066

Tapia B., CG. 1998. Caracterización morfológica y molecular de la diversidad genética de la colección de *Pachyrhizus tuberosus* (LAM.) SPRENG. Del CATIE. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR. CATIE. 157 p.

Tapia B., CG y Sørensen, M. 2003. Morphological characterization of the genetic variation existing in a Neotropical collection of yam bean, *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. Genetic resources and crop evolution 50: 681-692

Talledo, D. y Escobar, C. 1999. Comparativo de la acción de los inhibidores de la mitosis en especies vegetales nativas del Perú. Scientia 1(1): 129-157

Talledo, D; Escobar, C y Arenas, N. 1999. Citogenética de *Pachyrhizus tuberosus* y *Pachyrhizus ahipa*: Ciclo celular y número cromosómico. Raíces y Tubérculos Andinos, Avances de Investigación I. CIP. Lima, Per. p 139-161

Talledo, D y Escobar, C. 2004. *Raíces Andinas – Contribuciones al conocimiento y a la capacitación*, Cap. 5: Genética de las células somáticas de raíces y tuberosas andinas. Lima, Per. p 77-94.

Upadhyaya, HD; Gowda, CL; Buhariwalla, HK y Crouch, JH. 2006. Efficient use of crop germplasm resources: identifying useful germplasm for crop improvement through core and mini-core collections and molecular marker approaches. Plant genetic resources. 4(1): 25- 35

Upadhyaya, HD; Gowda, CL y Sastry DVSSR. 2008. Plant genetic resources management: collection, characterization, conservation and utilization. Journal of SAT agricultural research. 6

Upadhyaya, HD; Gowda, CL. 2009. Managing and enhancing the use of germplasm – strategies and methodologies. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Andhra Pradesh, India. 236 p.

Villar, MLD y Valio, IFM. 1994. Rotenone and pachyrhizin in *P. tuberosus*: effect of endogenous rotenone and pachyrhizin on early growth of *Pachyrhizus tuberosus* (Lam.) Spreng. Proceedings of the first international symposium on tuberous legumes. Guadalupe, FWI. p. 21-24

Vos, P; Hogers R; Bleeker, M; Reijans, M; Lee, T van de; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M y Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23(21):4407- 4414

Weising, K; Nybom, H; Wolff, K y Kahl, G. 2005. *DNA fingerprinting in plants, principles, methods and applications*. 2 ed. CRC Press. Boca Ratón, Florida, US. 444 p.

Wilson, RF; Thomas, H y Charles, E. eds. 2004. *Legume crop genomics*. Estados Unidos. AOCS Press. p. 60-82

Zanklan, AS; Ahouangonou, S; Becker, HC; Pawelzik, E y Grüneberg, JW. 2006. Evaluation of the storage root-forming legume Yam Bean (*Pachyrhizus* spp.) under West African conditions. *Crop Science* 47:1934-1946.

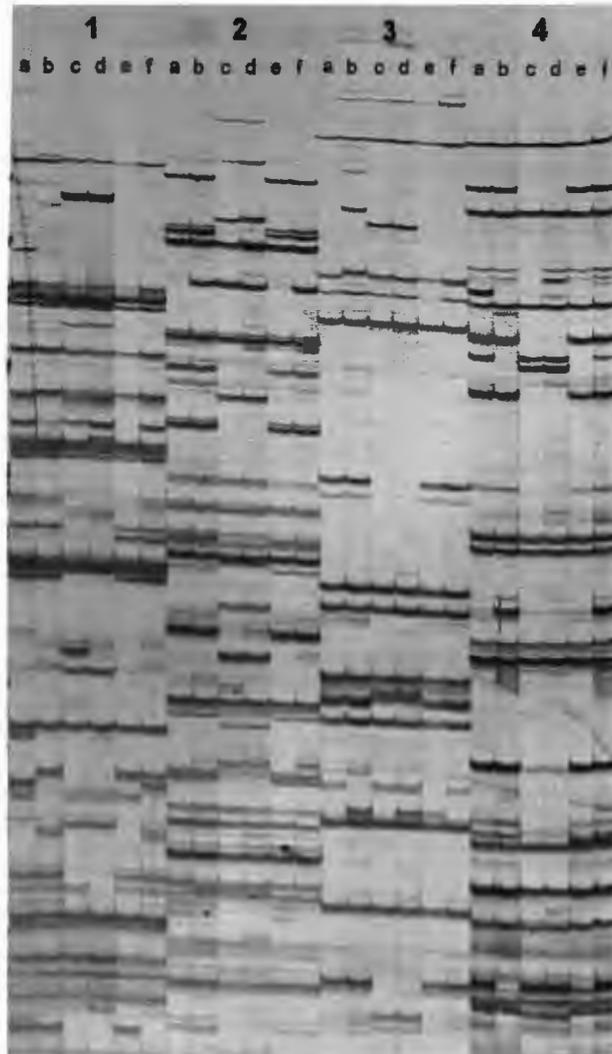
VIII. ANEXOS

Anexo 1. Porcentajes de fragmentos polimórficos para cada par de iniciadores evaluados en el tamizado.

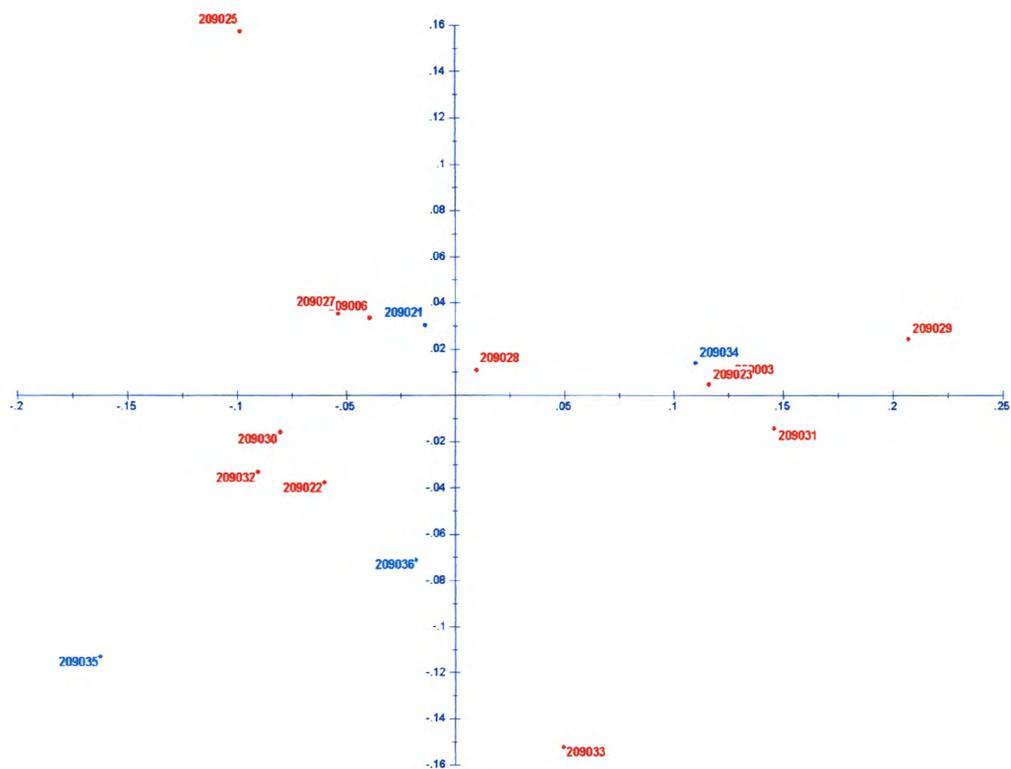
Iniciador	E32	E33	E34	E35	E36	E37	E38	E39	E40	E41	E42	E43	E44	E45	E46
M 35	41.7 (25)								42.9 (12)		55.6 (10)				
M 36		42.9 (15)		35 (7)					42.8 (9)					44.3 (27)	
M 37						52.9 (9)					66.7 (11)	70.7 (41)			
M 38									42.1 (8)				71.0 (27)		
M 39	40 (16)														53.4 (31)
M 40												66.1 (36)			
M 41															
M 42						41.9 (13)							55.4 (31)	45.8 (33)	
M 43															
M 44															
M 45														41 (16)	
M 46															
M 47	41.5 (17)														
M 48	44.4 (8)			17.6 (3)					7 (16)		50 (5)			37 (10)	67.2 (41)
M 49	52.2 (12)						47.8 (11)	30 (9)			41.7 (10)				
M 50						50 (13)	66.2 (15)				28.1 (6)				
M 51															
M 52															
M 53		47.6 (10)													
M 54								36.1 (8)	27.6 (6)						53.7 (29)
M 55							64.6 (7)								
M 56															
M 57	66.7 (9)											63.9 (29)			62.5 (5)
M 58															78.6 (11)
M 59	50 (17)		53.8 (35)				28.6 (4)							65.6 (40)	44.4 (16)
M 60															
M 61		52.9 (18)		46 (12)			71.4 (10)			38.5 (20)			55.6 (28)		

Entre paréntesis el número de fragmentos polimórficos y sombreados en rojo están las ocho combinaciones de iniciadores elegidos.

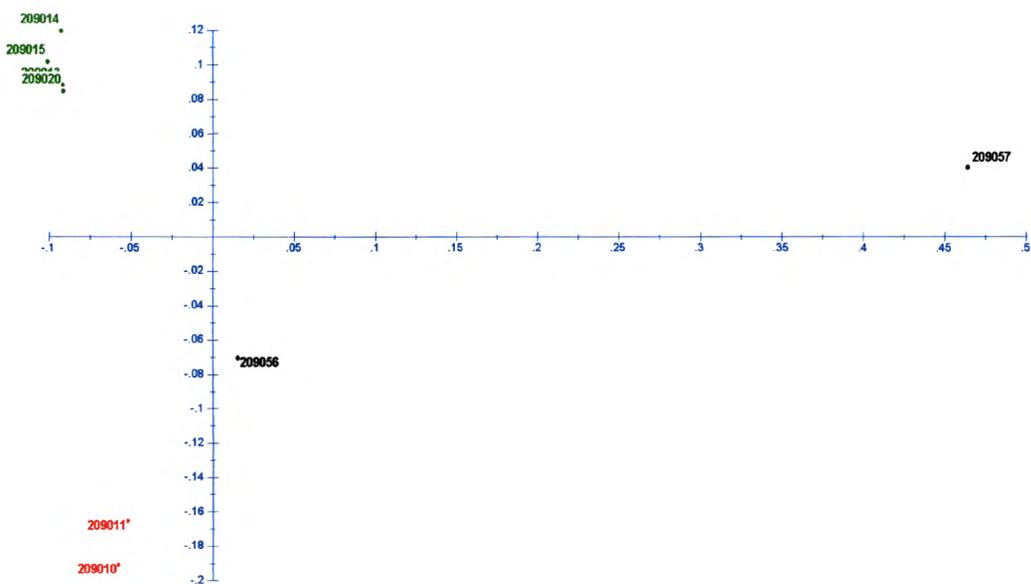
Anexo 2. Sección de gel mostrando los fragmentos generados por los iniciadores: 1. E45/M59, 2. E46/M42, 3. E46/M48 y 4. E46/M54. a) *P. ahipa* 209003 b) *P. tuberosus* 209010, c) *P. erosus* 209005 d) *P. erosus* 209019, e) Híbrido 209037 y f) Híbrido 209045



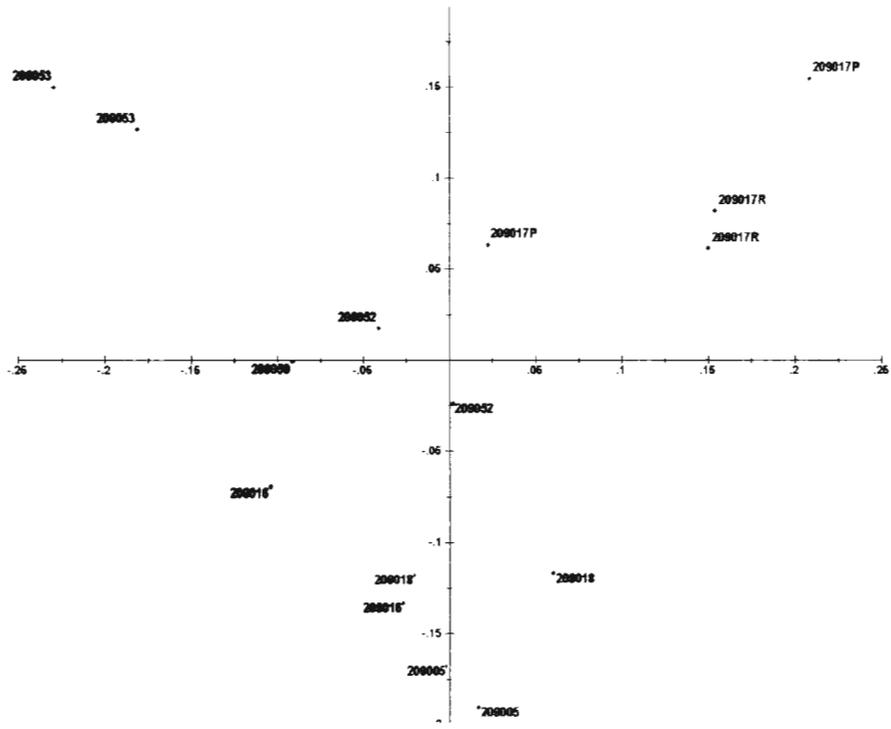
Anexo 3. Análisis de coordenadas principales para la especie *P. ahipa*. Las accesiones azules son originarias de Argentina y las granate son de Bolivia



Anexo 4. Análisis de coordenadas principales para la especie *P. tuberosus*. Las accesiones verdes corresponden al cultivar Chuin, las rojas a Ashipa y las negras son desconocidas.



Anexo 5. Análisis de coordenadas principales para la especie *P. erosus*. Las accesiones azules son originarias de Tonga, las amarillas de México, las verdes de Brasil, las negras de Guatemala y las rojas de China.



Anexo 6. Protocolo para extracción de DNA (pequeña escala) (Ghislain et al. 1999)

1. Pesar 100 mg de foliolos jóvenes y molerlos en un mortero (pre-congelado) con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
2. Transferir el polvo a un tubo Eppendorf. Agregar 700 ul de buffer CTAB 2X y 2 ul de β - mercaptoetanol y vortexear. Llevar a 65°C en baño maría por 45 min, agitando cada 15 min. Enfriar las muestras a temperatura ambiente durante 2 min.
3. Agregar 700 ul de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Vortexear brevemente y agitar volteando los tubos varias veces.
4. Centrifugar 5 min a 14,000 rpm en una microcentrifuga. Remover la fase acuosa y transferirla a un nuevo tubo Eppendorf rotulado. Evitar transferir el material de interface. Desechar el cloroformo:alcohol isoamílico en un contenedor apropiado.
5. Agregar 50 ul de CTAB 10% (en 0.7 M NaCl), vortexear brevemente
6. Repetir pasos 3 y 4.
7. Añadir un volumen igual de isopropanol helado (400- 500 ul) a cada tubo. Agitar volteando los tubos varias veces y dejar a 4 °C durante 30 min o a -20 °C por 15 min.
8. Centrifugar a 14,000 rpm durante 20 min. Eliminar el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet de DNA. Invertir los tubos y secar al medio ambiente (1- 2 min).
9. Lavar el pellet de DNA con 1000 ml de etanol al 70 % (durante 3 min) y centrifugar por 30 min a 14,000 rpm. Cuidadosamente eliminar el etanol, lavar el pellet en 1 ml de etanol al 90 % y centrifugar por 30 min a 14,000 rpm, y cuidadosamente eliminar el etanol. Invertir los tubos y dejar secando durante una noche o usar bomba de vacío por 15 min.
10. Disolver el DNA de cada muestra en 150 ul de T₁₀E₁ o agua destilada, agregar 1- 2 ul de RNase – libre de DNase (10 mg/ml). Incubar a 37 °C por 1 h.
11. Almacenar a 4 °C (o a -20 °C si es para periodos largos de tiempo)

Anexo 7. Protocolo para desarrollar polimorfismos en longitud de fragmentos amplificados (AFLPs)

1. Digestión de DNA genómico

1.1 Preparar la mezcla de restricción (RMM)

1.2 Preparar las muestras de DNA en una placa de amplificación, agregando 1 ul del DNA stock y completando a 20 ul con agua destilada. Luego agregar 20 ul del RMM.

1.3 Incubar a 37 °C por 3 h

1.4 Chequear la completa digestión en un gel de agarosa al 1% utilizando 5 ul de las muestras.

2. Ligación de adaptadores específicos

2.1 Preparar el mezcla de ligación (LMM)

2.2 Agregar 15 ul del LMM a los 35 ul del DNA digerido

2.3 Incubar a 37 °C por 3 h

2.4 Diluir con 150 ul de T₁₀E_{0.1} para obtener un volumen final de 200 ul

2.5 Guardar a -20 °C

3. Amplificación de los fragmentos de restricción

3.1 Preparar el master mix de pre- amplificación(PMM)

3.2 Preparar en una placa 5 ul del DNA digerido y ligado y agregar 15 ul del PMM

3.3 Realizar 20 ciclos de amplificación (92 °C por 60 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 60 s)

3.4 Diluir los 20 ul en 500 ul de tampón T₁₀E_{0.1} y guardar a -20 °C.

4. Amplificación selectiva de los fragmentos de restricción

4.1 Preparar el master mix de amplificación (AMM)

4.2 Preparar en una placa 5 ul del DNA pre- amplificado y agregar 15 ul del AMM

4.3 Realizar el ciclo de amplificación siguiente: Ciclo 1, 94 °C por 30 s, 65 °C por 30 s y 72 °C por 60 s; ciclo 2-13, 94 °C por 30 s, (65 – 0.7) °C en cada ciclo por 30 s y 62 °C por 60 s y ciclo 14-36, 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 60 s.

4.4 Llevar a cabo el análisis en gel de poliacrilamida al 6% con urea 7 M.

Anexo 8. Protocolo para electroforesis en gel de poliacrilamida (Ghislain et al. 1999)

1. Preparar las láminas de vidrio. Estas deben estar meticulosamente limpias. Enjuagar las laminas en agua desionizada y al final realizar un lavado con alcohol.
2. Para la lámina pequeña preparar solución adherente fresca agregando 3 ul de bind silane a 1 ml de etanol al 95 % y 3 ul de ácido acético. Con un tissue aplicar esta solución a la lámina cubriéndola completamente. Después de 4-5 min, aplicar aproximadamente 2 ml de etanol al 95 % al papel tissue y frotar en la lámina, repetir este paso tres veces para eliminar exceso de solución adherente.
3. Cambiarse de guantes para la preparación de la lámina grande. Frotar la lamina con un tissue con solución repelente. Luego de 5-10 min remover el exceso de repelente frotando la lámina con un tissue limpio.
4. Disponer las placas a manera de “sándwich” con ayuda de ganchos y espaciadores. La presión ejercida por los ganchos debe ser uniforme en toda la placa.
5. Preparar el gel tomando 60 ml de solución de poliacrilamida al 6 % y agregando 330 ul de APS y 33 ul de temed.
6. Agregar el gel cuidadosamente para que no se formen burbujas, colocar el peine entre las placas y dejar polimerizar por lo menos durante 2 h. Pre-correr el gel a 500 V durante 20-30 min.
7. Agregar 5 ul de colorante de carga y cargar las muestra al gel. Correr a 100 V durante toda una noche o a 1200 V durante 5-6 h.

Anexo 9. Tinción del gel con nitrato de plata (Ghislain et al. 1999)

1. Preparar las siguientes soluciones:

Fijador/solución stop (10% ácido acético glacial)- Agregar 100 ml de ácido acético glacial a 900 ml de agua destilada. Preparar dos soluciones separadas y separar para reutilizar.

Solución de tinción- Combina 2 g de nitrato de plata (AgNO_3) y 3 ml de formaldehído al 37 % en 2 l de agua destilada

Solución de revelado- Disolver 60 g de carbonato de sodio (Na_2CO_3) en 2 l de agua destilada. Mantener a 10 °C. Inmediatamente antes de usar agregar 3 ml de formaldehído al 37 % y 400 μl de tiosulfato de sodio (10 mg/ml).

2. Terminada la corrida separar las placas con ayuda de una cuña. El gel debe estar completamente pegado en la lámina pequeña.
3. Fijar el DNA sumergiendo la lamina con el gel (el gel hacia arriba) en una bandeja con la solución fijadora/stop y llevar a agitación por 20 min o hasta que no se vea mas el colorante.
4. Lavar el gel dos veces (2 min cada una) en agitación con agua destilada. Que la lamina escurra de 10-20 s antes de pasar al siguiente lavado.
5. Transferir el gel a la solución de tinción y agitar por 30 min. Completar la preparación de la solución de revelado. Agregar la mitad en una bandeja y reservar el resto.
6. Lavar el gel sumergiéndolo en agua destilada, escurrir y ponerlo inmediatamente en la bandeja con la solución de revelado. El tiempo de lavado esta vez es de 5-10 s.
7. Agitar la bandeja con la solución de revelado hasta que aparezcan las primeras bandas. Desechar la solución y agregar la que se había reservado. Agitar hasta que todas las bandas sean visibles.
8. Para terminar de revelar y fijar el gel, ponerlo en una bandeja conteniendo la solución stop y mantener en agitación 2-3 min.
9. Enjuagar el gel en agua destilada durante 2 min.
10. Secar el gel a temperatura ambiente.

Anexo 10. Preparación de buffers para extracción de DNA

1. Tampón CTAB 2X

Stock	Final	100 ml
CTAB	2%	2 g
NaCl 5 M	1.4 M	28 ml
EDTA 0.5 M	20 mM	4 ml
Tris HCl, pH 8.0 1M	100 mM	10 ml
PVP	1%	1 g
Agua destilada		Hasta 100 ml

Nota: Puede ser almacenado a temperatura ambiente

2. Tampón T₁₀E₁

Stock	Final	1 l
Tris HCl, pH 8.0	10 mM	10 ml
EDTA pH 8.0 0.5 M	1 mM	2 ml
Agua destilada		Hasta 1 l

Nota: Esterilizar en autoclave y guardar a temperatura ambiente

Anexo 11. Preparación de Buffers y mezclas de reacción para AFLP

1. Tampón 5X RL

Stock	Final	1 ml
Tris HAc, pH 7.5 1 M	50 mM	50 ul
MgCl ₂ 1 M	50 mM	50 ul
KAc 1 M	250 mM	250 ul
DTT 250 mM	25 mM	100 ul
BSA 10 ug/ul	250 ng/ul	25 ul
Agua destilada		Hasta 1000 ul

Nota: Guardar a -20 °C. Ac= Acetato

2. Solución de adaptadores EcoA

EcoA (5 uM)	ug	Stock	600 ul
Eco A1	17	9.459 ug/ ul	1.8
Eco A2	15	13.268 ug/ul	1.1
Agua destilada			Hasta 600 ul

3. Solución de adaptadores MseA

MseA (50 uM)	ug	Stock	140 ul
Mse A1	40	9.4537ug/ ul	4.25
Mse A2	35	10.721 ug/ul	3.25
Agua destilada			Hasta 140 ul

4. Tampón PCR 10X

Stock	Final	10 ml
Tris HCL, pH 8.3 1 M	100 mM	1 ml
MgCl ₂ 1 M	15 mM	0.15 ml
KCl 1 M	500 mM	5 ml
Agua destilada		Hasta 10 ml

Nota: Guardar a -20 °C

5. Tampón T₁₀E_{0.1}

Stock	Final	1L
Tris HCl, pH 8.0	10 mM	10 ml
EDTA pH 8.0 0.5 M	0.1 mM	0.2 ml
Agua destilada		Hasta 1 l

Nota: Esterilizar en autoclave y almacenar a temperatura ambiente

6. Mezcla de reacción de restricción

Reactivos	Por Reacción (ul)
Agua destilada	10.25
Buffer 5X RL	8
Eco RI 10U/ul	0.5
Msel 4U/ul	1.25

7. Mezcla de reacción de ligación

Reactivos	Por reacción (ul)
Agua destilada	9
EcoA	1
MseA	1
ATP 10mM	1
Buffer 5X RL	2
T4 DNA ligasa (1U/ul)	1

8. Mezcla de reacción de pre-amplificación

Stock	Por reacción (ul)
Agua destilada	10.92
EcoA1 50 ng/ul	0.6
MseA1 50 ng/ul	0.6
dNTPs 5mM	0.8
Buffer PCR 10X	2
Taq Polimerasa (5 U/ul)	0.08

Nota: Nota: Diluir los iniciadores EcoA1 y MseA1 a 50 ng/ul

9. Mezcla de reacción de amplificación

Stock	Por reacción (ul)
Agua destilada	11.02
Primer Eco 50 ng/ul	0.5
Primer Mse 50 ng/ul	0.6
dNTPs 5 mM	0.8
Buffer PCR 10X	2
Taq polimerasa (5 U/ul)	0.08

Anexo 12. Preparación de soluciones tampón para electroforesis en gel de acrilamida

1. Solución de poliacrilamida al 6%

Stock	Final	1l
Urea	7 M	420 g
Acrilamida- bisacrilamida	6%	57 g - 3 g
TBE 10X	1 X	50 ml
Milli- Q H2O		Hasta 1 l

Nota: Filtrar y guardar a 4 °C en una botella envuelta en papel aluminio

2. Tampón TBE 10X

Stock	1l
Tris base	108 g
Acido bórico	55 g
EDTA, pH 8.0 0.5 M	40 ml
Agua destilada	Hasta 1 l

3. Colorante de carga

Stock	10 ml
Formamida	9.4 ml
EDTA 0.2 M	500 ul
Tinte	100 ul

Nota: Tinte = 50 mg xilene cianol + 50 mg de azul de bromofenol disueltos en 1 ml de agua destilada