



UNIVERSIDAD DE GUADALAJARA

Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias

**Determinación de Variabilidad Intra e
Interespecífica en Colectas de Camote de
Cerro (*Dioscorea* spp.) en el Estado de
Jalisco, México**

**Tesis
que para obtener el grado de**

**Doctora en Ciencias en Biosistemática,
Ecología y Manejo de Recursos Naturales y
Agrícolas**

Presenta

Ana Paulina Velasco Ramírez

**Dr. Fernando Santacruz Ruvalcaba
Director**

Zapopan, Jalisco

27 de enero de 2014

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	<i>i</i>
LISTA DE CUADROS	<i>iv</i>
LISTA DE FIGURAS	<i>vi</i>
RESUMEN	<i>viii</i>
ABSTRACT	<i>ix</i>
I INTRODUCCIÓN	1
II ANTECEDENTES	3
2.1 Distribución de <i>Dioscorea</i>	3
2.1.2 Taxonomía del camote de cerro	4
2.1.3 Distribución del género <i>Dioscorea</i> en Jalisco	5
2.1.4 Aprovechamiento del camote de cerro en Jalisco	6
2.2 El uso y la importancia de los recurso fitogenéticos	6
2.3 Caracterización morfológica	9
2.4 ¿Qué son los marcadores moleculares?	11
2.4.1 Marcadores moleculares basados en ADN	13
2.4.1.1 RAPD (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)	13
2.4.1.2 AFLP (<i>Amplified Fragment Length Polymorphism</i>)	14
2.4.1.3 ISSR (<i>Inter Simple Sequence Repeats</i>)	16
2.4.1.4 ISTR (<i>Inter Sequence-Tagged Repeat</i>)	18
2.5 Diversidad genética en camote de cerro	23
2.6 Micropropagación <i>In vitro</i> en <i>Dioscorea</i>	25
III HIPÓTESIS	28
IV OBJETIVOS	28

V MATERIALES Y MÉTODOS	29
5.1 Lugar de trabajo	29
5.2 Colecta de material vegetal	29
5.2.1 Establecimiento del camote de cerro en vivero	30
5.2.2 Conservación y propagación de material vegetal <i>in vitro</i>	31
5.3 Extracción de ADN genómico	32
5.4 Pruebas de eficiencia de marcadores moleculares dominantes	33
5.4.1 Detección de los marcadores RAPD por medio de amplificación de PCR	34
5.4.2 Detección de los marcadores ISSR por medio de amplificación de PCR	34
5.4.3 Detección de los marcadores AFLP por medio de amplificación de PCR	35
5.4.4 Detección de los marcadores ISTR por medio de amplificación de PCR	36
5.5 Análisis de datos moleculares	37
5.6 Caracterización morfológica	39
5.7 Identificación taxonómica	41
VI RESULTADOS	42
6.1 Comparación de protocolos de extracción de ADN es especies de <i>Dioscorea</i>	42
6.2 Comparación de la información generada por los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR	44
6.3 Determinación de variación intra e interespecífica en poblaciones <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> utilizando el marcador molecular ISTR	51
6.3.1 Heterocigosidad esperada	54
6.3.2 Estructura genética	57
6.4 Análisis de características morfológicas	60
6.5 Identificación taxonómica	68

VII CONCLUSIONES	69
VIII LITERATURA CITADA	71
APÉNDICE	82

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1.- Clasificación del camote de cerro	5
Cuadro 2.- Comparación de marcadores moleculares	23
Cuadro 3.- Ubicación geográfica de las poblaciones colectadas para el presente trabajo.	29
Cuadro 4.- Accesiones de camote de cerro cultivadas <i>in vitro</i> .	31
Cuadro 5.- Comparación de los métodos de extracción utilizados en este estudio.	32
Cuadro 6.- Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.	37
Cuadro 7.- Resumen de análisis de varianza para parámetros de calidad de ADN.	43
Cuadro 8.- Prueba de diferencia mínima significativa para parámetros de calidad de ADN.	43
Cuadro 9.- Accesiones de <i>Dioscorea</i> utilizadas en este experimento.	44
Cuadro 10.- Comparación de los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR evaluando diversidad genética en materiales <i>ex vitro</i> en <i>Dioscorea</i> spp.	46
Cuadro 11.- Correlación de las matrices de similitud derivados de RAPD, ISSR, AFLP e ISTR.	49
Cuadro 12.- Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con tres combinaciones de cebadores de ISTR en accesiones de <i>Dioscorea</i> spp <i>ex vitro</i> .	52

Cuadro 13.- Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con tres combinaciones de cebadores de ISTR en accesiones de <i>Dioscorea spp in vitro</i> .	53
Cuadro 14.- Distribución de los materiales de acuerdo a los grupos generados en el análisis de agrupamiento.	55
Cuadro 15.- Valores de diferenciación genética (Fst) obtenidos para los valores de <i>K</i> (1-6) sugeridos por el programa STRUCTURE.	58
Cuadro 16.- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componentes principales en accesiones de <i>Dioscorea spp</i> .	64
Cuadro 17.- Vectores propios de los primeros cuatro componentes principales de las variables morfológicas.	66

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1.- Representación de la diversidad vegetal existente en el área de acción cotidiana de un grupo humano.	7
Figura 2.- Tipo de datos y descriptores.	11
Figura 3.- Esquema de la técnica empleada en RAPDs.	14
Figura 4.- Esquema de la técnica empleada en AFLPs	16
Figura 5.- Esquema de la técnica empleada en ISSRs	17
Figura 6.- Esquema de la técnica empleada en ISTRs.	22
Figura 7.- Factores determinantes de la diversidad genética.	24
Figura 8.- Sitios de colecta de las poblaciones naturales de <i>Dioscorea</i> spp. en 11 localidades de Jalisco.	30
Figura 9.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Resultados obtenidos con el método reportado por Keb-Llanes y el método reportado por Cota-Sánchez.	42
Figura 10.- Patrones de bandas en geles con cuatro marcadores moleculares que muestran polimorfismo en <i>Dioscorea</i> spp. (a) RAPD, (b) ISSR, (c) AFLP (d) ISTR. M: Marcador de peso molecular, las localidades 1-8 Chapala, San Antonio, Ahualulco, 9-12 de Ahualulco, Ixtlahuacán de los Membrillos, La Manzanilla de la Paz, 13-16 de La Manzanilla de la Paz, Acatic, Ixtlahuacán del Río, 17 - 24 Ixtlahuacán del Río, San Gabriel.	45
Figura 11.- Comparación de relaciones genéticas entre genotipos de <i>Dioscorea</i> revelados por a) RAPD, b) ISSR, c) AFLP d) ISTR.	47
Figura 12.- Análisis de agrupamiento y bootstrap para 24 individuos de <i>Dioscorea</i> spp. basado en marcadores moleculares.	48

Figura 13.- Patrones de amplificación con tres combinaciones de cebadores para el marcador ISTR en muestras <i>ex vitro</i> .	51
Figura 14.- Patrones de amplificación con tres combinaciones de cebadores de ISTR utilizadas. Muestras <i>in vitro</i> .	53
Figura 15.- Dendrograma donde se muestra el agrupamiento de 150 materiales <i>ex vitro</i> e <i>in vitro</i> de <i>Dioscorea</i> spp. provenientes de diferentes localidades del estado de Jalisco, analizados con tres combinaciones de cebadores de ISTR.	53a
Figura 16.- Representación gráfica del análisis con el programa STRUCTURE donde se muestra la simulación $K=6$ seis simulaciones.	58
Figura 17.- Clasificación de las 100 accesiones de camote de cerro con base a las 32 características morfológicas de la planta.	62
Figura 18.- Gráfica blipot donde se representan las variables y genotipos de camote de cerro en función de los dos primeros componentes principales. Acatic (●), Chapala (■), Cocula (◆), Ixtlahuacán de los Membrillos (▲), Ixtlahuacán del Río (△), Manzanilla de la Paz (⊠), San Antonio (■), San Gabriel (Ⓜ), Zapotlanejo (▲), Autlán (▼), San Martin Hidalgo (◆).	65
Figura 19.- Material herborizado de las especies <i>D. remotiflora</i> y <i>D. sparsiflora</i> .	68

RESUMEN

El género *Dioscorea* es una planta que produce tubérculos, es conocida en gran parte del mundo por su gran valor alimenticio, medicinal e industrial. En la actualidad, en Jalisco, las especies de *Dioscorea* conocidas como camote de cerro se encuentran sólo de forma silvestre, pero sus poblaciones están escasas debido a la colecta indiscriminada, hecha por los mismos colectores de las localidades. El objetivo de este estudio, fue caracterizar molecularmente por medio de los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR las colecciones de camote de cerro *Dioscorea* spp. del estado de Jalisco para evaluar la variabilidad genética intra e interpoblacional. La evaluación de la eficiencia de los marcadores moleculares de acuerdo al contenido de información polimórfica fue muy similar para todos los marcadores (≈ 0.48). El promedio de heterocigosidad fue menor para ISTR (0.36) y el mayor para AFLP (0.47). Esto indica un nivel importante de variación genética a pesar de que el camote de cerro se propaga asexualmente. Sin embargo la baja correlación hecha con los cuatro marcadores moleculares muestra la complementariedad de la información que se genera para estudios genéticos que implica la estimación de polimorfismo y las relaciones genéticas. Los ISTR son reproducibles y sensibles para detectar variación genética, lograron determinar variabilidad intra e interespecífica, en materiales *ex vitro* el coeficiente de Jaccard tuvo valores que variaron de 0.56 a 0.94 y los *in vitro* obtuvieron una variación de 0.66 a 0.95. De lo cual puede inferirse que existe mayor similitud genética entre los individuos de las accesiones conservadas *in vitro*. Fueron registrados y utilizados caracteres morfológicos para correlacionar fenotipos y caracterización molecular, por medio de análisis fenéticos, de acuerdo a una identificación taxonómica se determinaron dos especies *Dioscorea sparsiflora* y *Dioscorea remotiflora*. Los datos obtenidos en este estudio, proporcionan información para el comienzo de programas de conservación para este importante recurso fitogenético.

ABSTRACT

The genus *Dioscorea* is a plant that produces tubers, is known in the world for its high nutritional, medicinal and industrial value. Today, in Jalisco, *Dioscorea* species camote de cerro are just wild, but their populations are scarce due to the indiscriminate collection, made by the same collectors locations. The aim of this study was to characterize molecularly through molecular markers RAPD, ISSR, AFLP and ISTR camote de cerro collections collected in the state of Jalisco to assess the genetic variability within and between populations. The evaluations of the efficiency of molecular markers according to polymorphic information content were very similar for all markers (≈ 0.48). The average heterozygosity was lower for ISTR (0.36) and the highest for AFLP (0.47). This indicates a significant level of genetic variation despite the camote de cerro is asexually propagated. However low correlations made with four molecular markers shows the complementary information that is generated for genetic studies involving polymorphism and estimating genetic relationships. The ISTR are reproducible and sensitive for detecting genetic variation, were able to determine intra and interspecific variability to *ex vitro* plants, the Jaccard coefficient had values that ranged from 0.56 to 0.94 and *in vitro* obtained a variation from 0.66 to 0.95. From which it may be inferred that there is greater genetic similarity between individuals of the accessions conserved *in vitro*. Were recorded and used to correlate phenotypes morphological and molecular characterization via phenetic analysis, according to two species taxonomic identification and *Dioscorea remotiflora* and *Dioscorea sparsiflora* determined. The data obtained in this study provide information for the beginning of conservation programs for this important plant genetic resource.

I INTRODUCCIÓN

Las plantas que producen raíces y tubérculos desempeñarán una función múltiple en la alimentación del mundo en desarrollo durante las próximas décadas. Para el 2020, más de 2 mil millones de personas de Asia, África y América Latina dependerán de estos cultivos como fuente de alimento, forraje o ingresos en efectivo (CONABIO, 2000).

El género *Dioscorea* (Dioscoreaceae) agrupa plantas conocidas como camote de cerro en el occidente de México, barbasco y cabeza de negro en el sur de México, ñame conocido en América Latina y yam en el idioma Inglés, las cual representan un ejemplo de la riqueza de recursos fitogenéticos que posee México. Su estudio proporcionaría una fuente de información relevante desde muchos puntos de vista, medicinal, industrial y alimento.

En el estado de Jalisco, México, no existen variedades cultivadas de camote de cerro, actualmente, solo se dispone de material silvestre que ocasionalmente se propaga por los colectores que llevan muchos años en el trabajo de recolección; aún no existen trabajos de selección de germoplasma sobresaliente con relación a las especies presentes, ni ningún trabajo desde el punto de vista de diversidad genética.

En Jalisco, el camote de cerro tiene importancia económica. Los tubérculos se recolectan y comercializan en San Martín Hidalgo, Jocotepec, Villa Corona, Chapala y Zacoalco de Torres. Se aprovechan las especies silvestres pues su cultivo no existe, por lo que es necesario caracterizar las especies locales, conocer condiciones favorables, para lograr su establecimiento, manejo y conservación de germoplasma para las presentes y futuras generaciones.

Conocer un recurso, es necesario para asegurar su aprovechamiento racional y sostenible. El conocimiento implica aspectos morfológicos, fisiológicos, químicos, ecológicos y genéticos.

Entre las acciones que deben llevarse a cabo para el estudio y la conservación de recursos fitogenéticos, se encuentra la caracterización genética de las poblaciones silvestres. Proporciona herramientas que describen la diversidad genética inter e intrapoblacional y ofrece un marco teórico para entender los cambios evolutivos y la variación en los patrones genéticos de las poblaciones silvestres (Sosa y col., 2002). La determinación de la variabilidad vegetal requiere de la identificación de caracteres o marcadores que permitan discriminar entre las diferentes entidades vegetales.

Existen varios marcadores moleculares que pueden utilizarse en el estudio de la diversidad vegetal. Esos marcadores tienen sensibilidades variables para identificar diferencias genéticas, generan diferentes tipos de datos y se aplican a diferentes niveles taxonómicos (Karp y col., 1996).

Los marcadores moleculares RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) e ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) ofrecen la posibilidad de estudiar poblaciones de organismos y seleccionar aquellos que presentan rasgos de interés, los ISTR (Inter Sequence-Tagged Repeat) presentan una serie de ventajas con respecto a los otros marcadores, que los hace atractivos para la caracterización genética de plantas. Utilizan iniciadores universales, amplifican entre 5 y 100 loci. Detectan un polimorfismo considerable, son altamente reproducibles. No requieren gran cantidad ni alta calidad de ADN y se aplican a un amplio espectro de organismos (Lightbourn y Veilleux, 2003).

Existe poca información sobre estimaciones de variabilidad genética de camote de cerro en México, en Jalisco se han hecho estudios sobre aspectos morfológicos (Castillo, 2007) y citogenéticos (Castañeda-Nava, 2012). Por esta razón y con el fin de generar información del punto de vista molecular y dada la importancia que este recurso representa para Jalisco y al mismo tiempo el riesgo al que está siendo sometido por la sobreexplotación de que está siendo objeto, se considera que los resultados de este trabajo pueden ser relevantes.

II ANTECEDENTES

2.1 Distribución de *Dioscorea* spp

La familia Dioscoraceae agrupa a los géneros *Dioscorea* L., *Tacca* J. R. & G. Forst., *Trichopus* Gaertn. y *Stenomeris* Planch. (Caddick y col., 2002) *Dioscorea* es el grupo más diverso y tiene importancia económica, comestible y medicinal. Sus especies se encuentran distribuidas en las regiones lluviosas de los trópicos y regiones subtropicales (Montaldo, 1991). Entre 350 y 400 especies de *Dioscorea* son reconocidas y 63 especies crecen en México. En Jalisco, se ha registrado la presencia de nueve especies (Mc Vaugh 1989). La clasificación infragénica de *Dioscorea* está sujeta a discusión (Caddick y col., 2002) aunque Huber (1998) reconoció la presencia de 28 grupos.

Las especies de *Dioscorea* producen rizomas cortos y tubérculos comestibles. Las más comunes y con mayor valor comercial son *Dioscorea alata* L, *D. rotundata* Poir, *D. esculenta* L, *D. bulbífera* L y *D. cayenensis* Lam, las cuales son cultivadas principalmente en África (Mandal, 1993). *Dioscorea floribunda* Martens y *D. composita* Hemsl son apreciadas debido a su alto contenido de sapogeninas esteroidales; sustancias utilizadas en la fabricación de anticonceptivos orales, hormonas sexuales y cortisona. Sin embargo, éstos ñames farmacéuticos continúan siendo esencialmente especies silvestres (Rodríguez, 2000).

La zona dominante para la producción de *Dioscorea* en el mundo, es el oeste de África, donde se producen 48 millones de toneladas que equivalen a los 93% de la producción total mundial, cultivadas en 4 millones de hectáreas al año.

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

Las especies utilizadas a nivel mundial para la alimentación de acuerdo con Montaldo (1991) son: ***Dioscorea rotundata-cayenensis***: Constituye la mayor parte de la producción de ñame en África pero es una especie poco cultivada en América tropical. Según Kay (1987), su producción asciende a 19 millones de toneladas al año. Las plantas producen un tubérculo solitario generalmente grueso y ramificado. El tallo es cilíndrico y espinoso. Las hojas son simples, enteras, opuestas o alternas. ***Dioscorea alata***: Es originaria del Sureste Asiático y constituye la principal especie cultivada. Las plantas producen rizomas solitarios o agrupados de 2 a 4, redondos, cilíndricos, oblongos o de forma irregular. Sus tallos son fuertes, alados, sin espinas con hojas acorazonadas, simples y opuestas. ***Dioscorea esculenta***: Cultivada en el Sureste de Asia y África. Rizomas pequeños en forma de racimo, tallo espinoso y hojas simples, acorazonadas. ***Dioscorea bulbifera***: Cultivada en el Sureste de Asia, África y algo en las islas del Pacífico y en las Antillas. Un solo rizoma por planta, blanco y globoso; tallo sin espinas, hojas simples, enteras, grandes, alternas u opuestas. ***Dioscorea trifida***: Originaria y cultivada en América tropical y algo en el Sureste de Asia. Rizomas pequeños redondos o cónicos, tallo alados y sin espinas, hojas palmadas profundamente lobuladas y alternas.

2.1.2 Taxonomía del camote de cerro

En Jalisco, camote de cerro es el nombre común de *Dioscorea remotiflora* y *D. sparsiflora*. Morfológicamente, las plantas de ambas especies son similares. Sin embargo, los tallos y peciolos en *D. sparsiflora* son alados mientras que en *D. remotiflora* no presentan esta estructura. Más aún, la corola de las flores masculinas son en forma de taza en *D. sparsiflora* pero campanuladas en *D. remotiflora*. Por último, los filamentos de *D. sparsiflora* están unidos entre sí excepto en el ápice. En contraste, los filamentos en *D. remotiflora* son libres. Un resumen de la clasificación del camote de cerro se muestra en el Cuadro 1.

Cuadro 1.- Clasificación del camote de cerro.

Reino	<i>Plantae</i>
Subreino	<i>Tracheobionta</i>
Superdivisión	<i>Spermatophyta</i>
División	<i>Magnoliophyta</i>
Clase	<i>Liliopsida</i>
Subclase	<i>Liliidae</i>
Orden	<i>Dioscoreales</i>
Familia	<i>Dioscoreaceae</i>
Género	<i>Dioscorea</i>
Especie	350-400

2.1.3 Distribución del género *Dioscorea* en Jalisco

Para Jalisco, se reconocen 9 especies, *D. convolvulacea* Scheidw y y Cham, *D. jaliscana* McVaugh, *D. mexicana* Scheidw, *D. militaris* B.L. Rob, *D. nelsonii* Uline ex R. Knuth, *D. nematodes* Uline ex R. Kunth, *D. remotiflora* Kunth, *D. sparsiflora* Helms y *D. subtomentosa* Miranda. Solo los tubérculos de *D. remotiflora* y *D. sparsiflora* son alimento humano. En México, *Dioscorea remotiflora* crece en los estados de Sonora, Chihuahua, Sinaloa, Nayarit, Guanajuato, Jalisco, Colima, Michoacán, Guerrero, Oaxaca e Hidalgo (McVaugh, 1989). En Jalisco, se ha registrado en los municipios de Acatic, Autlán de Navarro, Jocotepec, Pihuamo, Tecalitlán y Manuel M. Diéguez. Por su parte, *D. sparsiflora* se distribuye en los estados de Nayarit, Jalisco, México, Morelos, Guerrero, Michoacán y Colima. En Jalisco, se ha recolectado en los municipios de Autlán de Navarro, Chapala, Cocula, Guadalajara, Jocotepec, La Manzanilla de la Paz, Poncitlán, San Martín de Bolaños, San Martín Hidalgo y Tapalpa.

2.1.4 Aprovechamiento del camote de cerro en Jalisco

En la región Ciénega de Chapala existen 325 camoteros que dependen directamente de esta actividad para subsistir, a su vez esto representa una población de 1622 personas ligadas a este recurso. Solo para este caso se extraen al año considerando una media de 7 meses de trabajo; un total de 182,000 plantas y que de estas, solo 365 volverán a producir al siguiente año (García-Ruiz, 2009)

El camote de cerro lo venden en peso fresco aproximadamente a \$30.00 pesos mientras que cocido vale el doble. Principalmente el aprovechamiento del camote de cerro es como alimento, los consumen hervido, tostado, freído, capeado con huevo o simplemente con sal y limón así mismo es muy usado para aliviar síntomas como fatiga, estrés, elaboran cremas como tratamiento de la menopausia y para algunos desórdenes fisiológicos femeninos ya que el camote contiene esteroides (diosgenina) su aplicación a través de la piel hace más fácil su absorción, por lo que se aprovecha mejor que cuando se administra vía oral.

2.2 El uso y la importancia de los recursos fitogenéticos

Según el Convenio de la Diversidad Biológica (CDB), los recursos genéticos son cualquier material de origen animal o vegetal, microorganismos u otros que contengan unidades funcionales de herencia. Podría incluir genes, secuencias genéticas, moléculas, extractos biológicos, semillas y plasma, (Hawtin y col., 1996). En primer lugar, los recursos genéticos son importantes porque confieren las características y propiedades particulares de los organismos. En segundo lugar, los recursos genéticos constituyen la base para el desarrollo de nuevas variedades vegetales o de cultivos, permiten el desarrollo de nuevos productos y son la base material para la biotecnología moderna y sus múltiples aplicaciones (la minería, la bioremediación, la ingeniería genética, entre otras) (Szabó, 2005). Los recursos fitogenéticos se clasifican de la siguiente manera, (Figura 1) (Cuevas y col., 1997)

DVT = Diversidad vegetal total, **PSU** = Plantas silvestres útiles, **PF** = Plantas fomentadas, **PT** = Plantas toleradas, **PC** = Plantas cultivadas y **PD** = Plantas domesticadas.

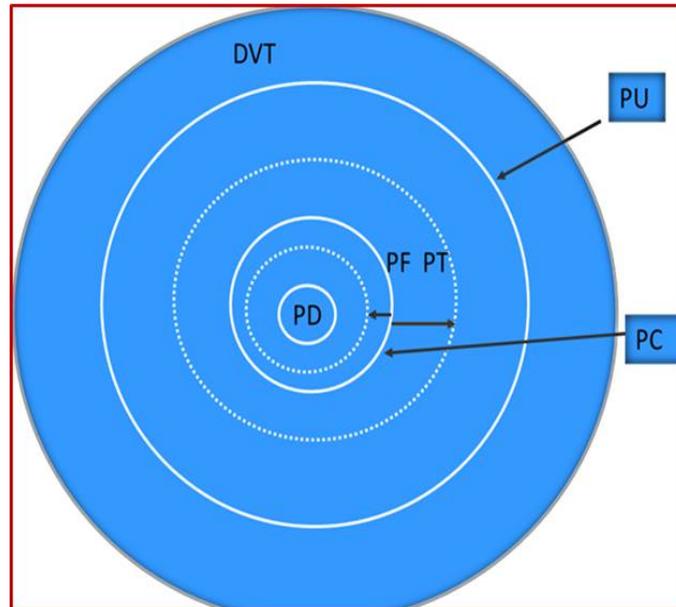


Figura 1.- Representación de la diversidad vegetal existente en el área de acción cotidiana de un grupo humano.

Plantas silvestres útiles (PSU): Consideradas desde el punto de vista antropocéntrico, las plantas útiles no son sólo un subconjunto de la diversidad vegetal total existente en el mundo, sino un subconjunto cuya magnitud depende en última instancia del acervo cultural de los grupos humanos que las aprovechan.

Plantas toleradas (PT): Aquellas especies que, por alguna razón, la gente de las localidades tenga conocimientos de efectos medicinales por ejemplo *Bursera* spp. o bien plantas que dan buena sombra como *Ceiba* spp. y no son derribadas al preparar un terreno virgen con fines agrícolas en las regiones tropicales de México.

Plantas fomentadas (PF): Aquellas plantas que, además de algunos usos secundarios, producen alguna estructura relacionada con la satisfacción de alguna necesidad básica (frutos y/o semillas comestibles), como consecuencia el hombre realiza algunas acciones concretas que propician su conservación y desarrollo (como en el caso de las especies que frecuentemente son utilizadas por los

campesinos para delimitar sus parcelas a manera de cercas vivas, plantas de las que además obtienen frutos, medicina y en última instancia leña para la cocción de sus alimentos), como en el caso de los géneros *Spondias* y *Guazuma*.

Plantas cultivadas (PC): Estatus en el que el hombre puede desarrollar solo después de un largo periodo de acumulación de experiencias y conocimientos relativos a la biología de sus recursos vegetales, así como del ambiente en que decidió establecer su cultivo.

Plantas domesticadas (PD): Fase a la que únicamente han podido arribar aquellas especies que por sus atributos biológicos particularmente los vinculados a su reproducción y la heredabilidad de los caracteres de interés han respondido favorablemente a la selección practicada por los grupos humanos en los diferentes ambientes (ecológicos y culturales) en que las han cultivado (Cervantes, 1976). Por lo tanto según la clasificación de Cuevas y col. (1997) y Cervantes (1976), el camote de cerro está clasificado dentro plantas silvestres útiles (PU).

Dicho lo anterior, México es un centro importante de diversidad y domesticación de plantas. La domesticación no es el resultado solamente de eventos biológicos, sino de la interacción, durante cientos de generaciones, entre poblaciones humanas y las especies vegetales. Estas poblaciones humanas, a raíz de sus necesidades, intereses, prácticas y conocimientos han ido conformando y manteniendo esta diversidad. Los agricultores mexicanos son los herederos de esta diversidad, sino quienes las mantienen y desarrollan, aún en condiciones cada vez más difíciles (Bellon, 2009).

El uso inteligente de los recursos fitogenéticos puede erradicar la pobreza. Reduce el precio de los alimentos y de otros productos. Aumenta y diversifica las ganancias de productores y procesadores. Sin embargo, los recursos genéticos, son vulnerables y pueden desaparecer, poniendo en peligro la continuidad de nuestra especie (Fuentes, 1998; Jaramillo y Baena, 2000).

La producción mundial de alimentos es suficiente para abastecer a la población mundial, si su distribución fuera equitativa (Fuentes, 1998; Calla y col., 1999).

Entonces, el problema no es la producción sino en que los países tecnificados almacenan grandes volúmenes de alimentos y en los países menos afortunados, no alcanzan a producir lo necesario para su supervivencia. El 74% de la actividad agrícola en México se realiza en tierras temporales (14,508,829 ha), ya que únicamente 26.5% (5,221,030 ha) de la superficie agrícola tienen irrigación. La agricultura de temporal está distribuida de forma más uniforme, los estados de Veracruz, Jalisco, Chiapas, Zacatecas y Oaxaca son los que tienen una mayor superficie de temporal y suman 37% de las tierras bajo esta condición. Este panorama permitirá incorporar nuevos cultivos que no requieran sistema de irrigación y con los que se pueda lograr un mejor aprovechamiento del agua temporal (CONABIO, 2000). Por lo tanto, es importante el aprovechamiento y la conservación de los recursos fitogenéticos, para evitar problemas de desaparición de especies de interés.

2.3 Caracterización morfológica

Los caracteres morfológicos han sido muy usados para la identificación de especies, géneros y familias de plantas. Además, las características morfológicas han sido el tema de numerosos estudios en genética de poblaciones y agricultura, donde la resistencia a plagas y enfermedades y el rendimiento han sido factores importantes (Falconer, 1981).

Diferentes niveles de variabilidad pueden ser estimados usando caracteres morfológicos. Su respuesta a la selección y sus antecedentes genéticos pueden ser determinados; estos tipos de caracteres son usualmente dominantes y recesivos. Es así que la mayoría de las plantas cultivadas con importancia económica tiene sus patrones de identificación, caracterización y evaluación. Para llegar a estos protocolos se han realizado estudios básicos de las características en el sentido de conocer la variabilidad de los caracteres dentro y entre plantas; luego se han seleccionado aquellas características cualitativas y cuantitativas que han resultado ser más útiles para la descripción (Enríquez, 1966).

Se entiende por caracterización a la descripción de la variación que existe en una colección de germoplasma. Por lo común, se utilizan características morfológicas y fenológicas de alta heredabilidad, es decir características cuya expresión es poco influenciada por el ambiente. La caracterización debe permitir diferenciar a las accesiones de una especie. En las plantas cultivadas, los órganos más importantes para la descripción morfológica son la flor y el fruto. Le siguen en importancia las hojas, troncos, ramas, raíces y los tejidos celulares que muchas veces son muy difíciles de caracterizar (Enríquez, 1991).

Para la caracterización morfológica se utilizan descriptores (características que se expresan para identificar a los individuos). Un buen descriptor debe ser fácilmente observable. También debe tener alta acción discriminante y baja influencia ambiental. La uniformización de los descriptores es un requisito para que la caracterización tenga un valor universal. Para ello, se utilizan listas de descriptores bien definidos y rigurosamente probados. Todo esto simplifica el registro, la actualización y la modificación de datos. Mejor aún, permite la recuperación el intercambio, el análisis y la transformación de datos.

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

Dentro de los caracteres morfológicos que definen a *Dioscorea*., existen distintas categorías de datos, según la expresión del descriptor que puede ser en forma cualitativa o cuantitativa (Figura 2). Si se expresa en forma cualitativa, se pueden generar datos binarios (también llamados de doble estado) datos con secuencia (ordinales) y datos sin secuencia (nominales). Si se expresa en forma cuantitativa, los datos generados pueden ser discontinuos (llamados también discretos) y continuos. (IPGRI, 2003).

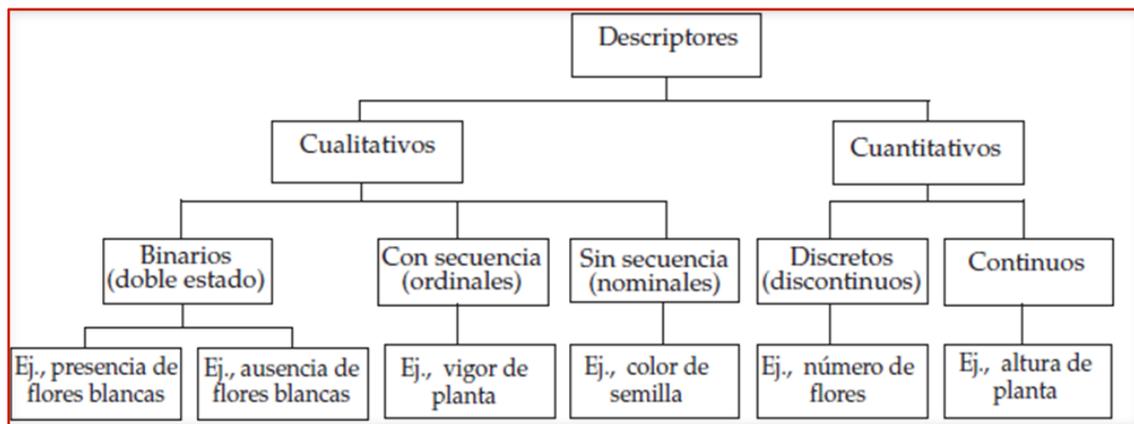


Figura 2.- Tipo de datos y descriptores.

2.4 ¿Qué son los marcadores moleculares?

Un marcador molecular es un carácter derivado del análisis de proteínas y ácidos nucleicos. En la actualidad, los más comunes son los derivados del análisis del ADN. Los primeros marcadores que se emplearon fueron aquellos que afectaban la morfología de la plantas. Estos marcadores generalmente son debidos a la mutación de un gen que provoca un fenotipo marcadamente diferente al fenotipo normal. Su empleo es limitado debido a su escasez y a que suelen presentar dominancia, pleiotropía y epistasis.

El desarrollo de los marcadores moleculares ha logrado un importante avance en la mejora de plantas. Los marcadores moleculares presentan una serie de ventajas frente a los marcadores morfológicos: se encuentran en cualquier

especie; se detectan en estadios tempranos del desarrollo y en cualquier tipo de tejido; su análisis no depende de las condiciones experimentales; son fenotípicamente neutros; y además, la interacción entre ellos es pequeña o nula (ausencia de epistasis).

Los marcadores bioquímicos incluyen a las proteínas y las isoenzimas o aloenzimas y constituyen la primera generación de marcadores moleculares. Después con la aparición de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR), los tipos de marcadores aumentó considerablemente, y en la actualidad, hay un gran número de tipo de marcadores basados en la PCR. Cada tipo de marcador tiene unas características específicas que lo hacen adecuado unas determinadas aplicaciones.

Los marcadores moleculares presentan múltiples aplicaciones en la mejora genética de plantas. Previamente hay que plantearse qué tipo de marcador es el apropiado a nuestras necesidades y para ello nos debemos plantear una serie de cuestiones como: ¿Qué objetivos tenemos? ¿Qué nivel de resolución requerimos? y también debemos preguntarnos ¿si nuestros recursos a nivel personal, equipo y tiempo son los adecuados?

El hecho que los marcadores moleculares puedan ser analizados en estadios tempranos del desarrollo les hace especialmente indicados para determinadas situaciones en las que se requieren la identificación del origen y/o naturaleza de los diferentes individuos de una población. Algunas de estas situaciones son: distinción entre individuos cigóticos y nucleares en plantas que presentan apomixis; distinción entre diploides y tetraploides, etc.

Los marcadores moleculares tienen varias propiedades con respecto al análisis de la diversidad genética y la relación que pueda existir dentro y fuera de las poblaciones en las especies, que por lo consiguiente es una tarea central para muchas disciplinas de la ciencias biológicas. Durante las últimas tres décadas, las

estrategias clásicas para la evaluación de la variabilidad genética como la anatomía comparada, morfología, embriología y fisiología, cada vez se han complementado con la técnica de los marcadores moleculares.

La tecnología de los marcadores moleculares basados en el polimorfismo de proteínas o de ADN ha catalizado la investigación en una variedad de disciplinas como son la filogenia, taxonomía, ecología, genética tanto en plantas como en animales.

Las siguientes propiedades serían generalmente las deseables para un marcador molecular: 1.-De moderada a altamente polimórficos 2.-Herencia codominante (permite la discriminación de los homocigotos y heterocigotos en organismos diploides), 3.-Asignación inequívoca de los alelos, 4.-Ocurrencia frecuente en el genoma, 5.- Comportamiento neutral, 6.- Fácil acceso (Que sean baratos y procedimientos rápidos), 7.- Alta reproducibilidad, 8.- Fácil intercambio de datos entre laboratorios, 9.- Bajo costo, tanto para el desarrollo de marcadores y ensayos, 10.- El mejor tipo de marcador molecular será aquel que abarque una mayor parte del genoma estudiado (Solís y Andrade, 2005).

No existe un solo tipo de marcador molecular que cumpla todos estos criterios, sin embargo se pueden elegir entre una variedad de sistemas de marcadores, que uno combine una parte o incluso la mayoría de las características antes mencionadas.

2.4.1 Marcadores moleculares basados en ADN

2.4.1.1 RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*)

Esta técnica se basa en la amplificación del ADN mediante PCR con un solo cebador de 10 nucleótidos de secuencia aleatoria. La reacción de amplificación da como resultado una serie de fragmentos de ADN de diferentes tamaños que pueden dar lugar a polimorfismos de tipo presencia/ausencia al ser separados por electroforesis. Se considera que la presencia de bandas con igual movilidad

corresponde en la misma posición del genoma, aunque esto no siempre es cierto cuando trabajamos con distintas especies.

El polimorfismo entre individuos se detecta debido a la falta de coincidencia en los sitios de reconocimiento de los cebadores, la presencia o ausencia de una secuencia reconocida por el cebador y la longitud de la secuencia amplificada (Figura 3) (Zhao y col., 2007a). En el Cuadro 2 se muestra las características de dicho marcador molecular.

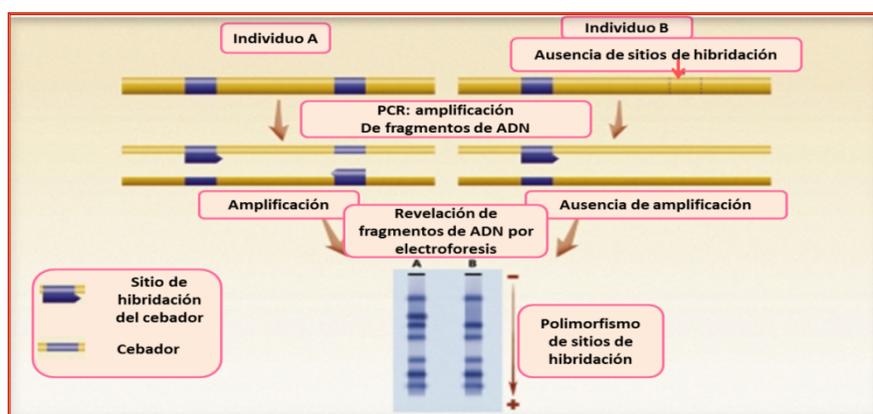


Figura 3.- Esquema de la técnica empleada en RAPDs.

2.4.1.2 AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*)

Esta técnica fue propuesta por KeyGene (Holanda), una empresa de biotecnología que adquirió los derechos de propiedad de esta tecnología (Vos y col., 1995).

Los AFLPs es una combinación de las tecnologías de RFLP y de PCR, es un método muy sensible para caracterizar el ADN de cualquiera que sea su origen y complejidad, se puede aplicar con ADN genómico total o con ADNc (ADN complementario).

La técnica de AFLP detecta polimorfismos generados por cambios (de presencia o tamaño) en los sitios de restricción o en los adyacentes a éstos. Se pueden usar diferentes enzimas de restricción (Figura 4). Distintas combinaciones de nucleótidos preselectivos y selectivos aumentarán la probabilidad de encontrar polimorfismos útiles: A mayor número de bases selectivas, menor detección de

polimorfismo, las bandas se registran, generalmente, como presentes o ausentes, en función del espesor de la banda, se pueden detectar bandas heterocigóticas y homocigóticas, aunque no siempre los resultados son confiables.

La base molecular de los polimorfismos de AFLP generalmente se origina en los nucleótidos. Se detectan cambios de un solo nucleótido cuando: (1) se afectan los propios sitios de restricción; y (2) se afectan los nucleótidos adyacentes a los sitios de restricción, lo que hará que los cebadores hibriden erróneamente en el extremo 3' impidiendo la amplificación.

La mayoría de los marcadores de AFLP son de tipo monoalélico, lo que significa que sólo se podrá registrar un alelo porque su alelo complementario no se detecta. Aunque es poco frecuente, se pueden identificar marcadores bialélicos como resultado de pequeñas inserciones o deleciones en los fragmentos de restricción.

La tecnología de AFLP puede aplicarse a cualquier muestra de ADN, lo que le da el potencial de convertirse en un sistema universal para la caracterización de ADN. En el Cuadro 2 se muestran las características de dicho marcador molecular.

Debido a la naturaleza de los cebadores de AFLP, los marcadores obtenidos son sumamente confiables y sólidos, y no son afectados por las pequeñas variaciones del proceso de amplificación. Una “huella identificadora” característica de AFLP contiene entre 50 y 100 fragmentos amplificados, muchos de los cuales pueden servir como marcadores genéticos.

La generación de perfiles de transcripción de AFLP con ADNc es una herramienta eficaz para identificar los ARNm expresados diferencialmente. Esta herramienta tiene ventajas que pueden ser útiles para descubrir genes en el germoplasma (Youssef y col., 2011).

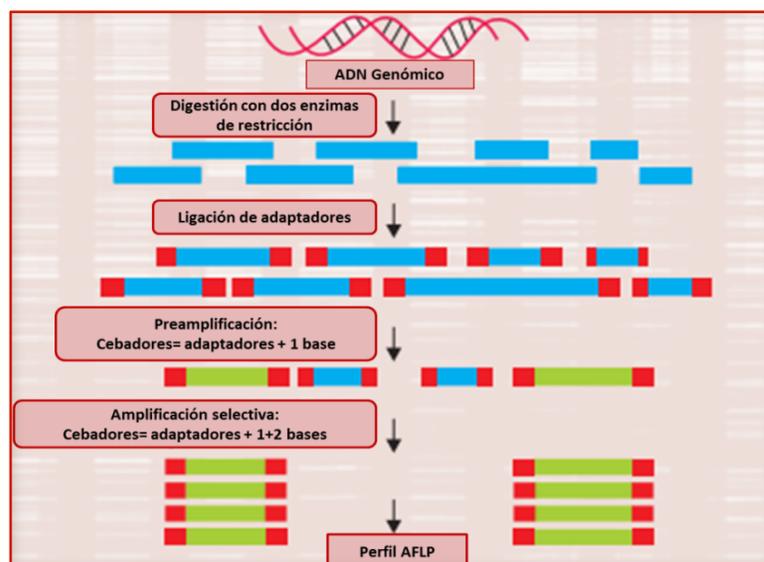


Figura 4: Esquema de la técnica empleada en AFLPs.

2.4.1.3 ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*)

Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem simples como (CT) ó (CA)_n, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte (Figura 5). Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta, tetra, tri y dinucleótidos.

Los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o cebador complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). En ocasiones es posible agregar a esta secuencia un par de nucleótidos extras arbitrarios en el extremo 3' o en el 5', que jugarán el papel de "anclas" asegurando así que la amplificación inicie siempre en el extremo 5' o en el 3' del microsatélite, respectivamente (Zietkiewicz y col., 1994; Bornet y Branchard, 2001; Pradeep y col., 2002).

El polimorfismo entre individuos de la misma población puede detectarse, ya que el análisis es sensible a la presencia/ausencia del elemento genómico reconocido por el cebador y a la longitud de la secuencia intermedia amplificada (Zietkiewicz

y col., 1994). En el Cuadro 2 se muestran las características de dicho marcador molecular.

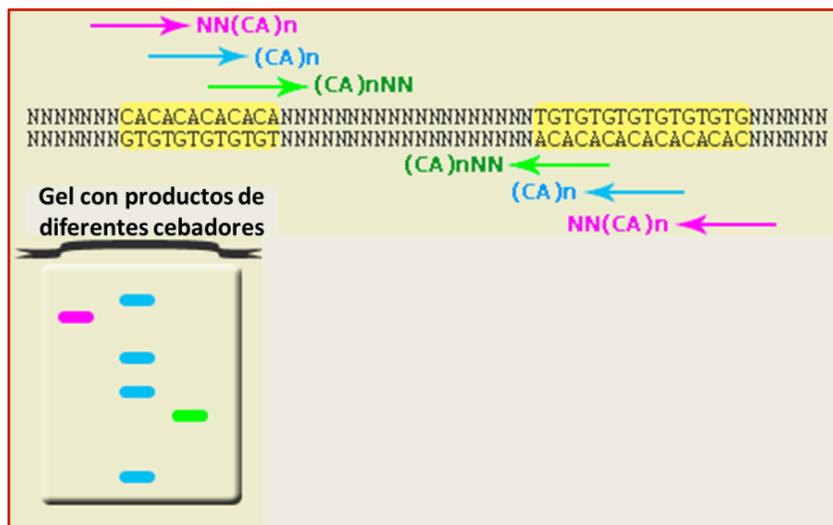


Figura 5.- Esquema de la técnica empleada en los ISSRs.

Las bandas de ISSRs son consideradas marcadores dominantes. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (homocigoto o heterocigoto), mientras que su ausencia representa el genotipo homocigoto recesivo. Se asume que existen dos alelos por locus.

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores: La no existencia de un sitio de unión completo al primer debido a una mutación, rearrreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis, inserciones o deleciones suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, de manera que se identifica como un locus diferente.

Los ISSRs pueden ser utilizados como marcadores en la resolución de múltiples problemas biológicos. Los polimorfismos que presentan, además de su heredabilidad, permiten aplicarlos en la identificación de individuos, distinción de variedades intraespecíficas (particularmente en especies con importancia económica), identificación de paternidad y maternidad, mapeo genético, evaluación de diversidad y subdivisión genética en poblaciones, reconstrucciones

filogenéticas, introgresión e hibridización, y distinción de individuos con origen clonal y sexual (Zietkiewicz y col., 1994; Wolfe, 2000; Pradeep y col., 2002).

2.4.1.4 ISTR (*Inter Sequence-Tagged Repeat*)

La técnica ISTR está basada en la detección de polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, lo que crea conexiones nuevas entre el ADN genómico y las secuencias altamente específicas que se encuentran limitando en ambos extremos a esos elementos transposables, los cuales para insertarse en el genoma requieren la síntesis de una molécula de ADN a partir de una de ARN, que sirve de molde (Lightbourn y Villeux, 2003).

Los transposones (TEs) son fragmentos de ADN que pueden pasar de un cromosoma a otro sin una etapa de existencia independiente (Figura 6). Los descubrió Barbara Mc Clintock (1950), en el genoma del maíz.

Son elementos del genoma del maíz que tenían la capacidad de moverse favoreciendo la aparición de determinados fenotipos. En algunos casos se rompe el cromosoma y se insertan en otro lugar; otras veces, el fragmento original permanece en su sitio y una copia se inserta en otro lugar. Otras veces, se copian primero en ARN y, a través de una transcriptasa inversa, producen ADN que se inserta en un cromosoma. Cuando cambian de posición y abandonan el lugar en el que estaban, en ese sitio, se produce una deleción o pérdida de bases. Si el elemento transponible estaba insertado en el interior de un gen, puede que se recupere la función de dicho gen

De igual forma, si el elemento genético móvil al cambiar de posición se inserta dentro de un gen se produce una adición de una gran cantidad de nucleótidos que tendrá como consecuencia la pérdida de la función de dicho gen.

Por consiguiente, los elementos genéticos transponibles producen mutaciones.

En bacterias existen dos tipos de elementos genéticos móviles:

Transposón Simple Secuencia de Inserción o Elemento de Inserción (IS): los transposones simples contienen una secuencia central con información para la proteína transposasa

Transposón Compuesto (Tn): contiene un elemento de inserción (IS) en cada extremo en y una región central que además suele contener información de otro tipo. Por ejemplo, los factores de transferencia de resistencia (RTF), poseen información en la zona central para resistencia a antibióticos (cloranfenicol, kanamicina, tetraciclina, etc.).

Transposones en mamífero se conocen tres clases de secuencias que son capaces de transponerse o cambiar de posición a través de un ARN intermediario:

Retrovirus endógenos: semejantes a los retrovirus, no pueden infectar nuevas células y están restringidos a un genoma, pero pueden transponerse dentro de la célula. Poseen largas secuencias repetidas en los extremos (LTR), genes *env* (con información para la proteína de la cubierta) y genes que codifican para la transcriptasa inversa, como los presentes en retrovirus.

Retrotransposones o retroposones: sólo contienen genes para la transcriptasa inversa y pueden transponerse.

Retropseudogenes: carecen de genes para la transcriptasa inversa y por consiguiente son incapaces de transponerse de forma independiente, aunque si pueden cambiar de posición en presencia de otros elementos móviles que posean información para la transcriptasa inversa.

Los retrotransposones son elementos que se transponen mediante ARN, donde participa la transcriptasa inversa (Figura 6). Existen dos tipos de súper familias, viral y no viral. En la súper familia viral es donde se incluyen los retrovirus y los retrotransposones derivados de éstos o emparentados con ellos. (Rhode, 1996).

Los retrovirus son virus de ARN de cadena sencilla que pueden fabricar copias de ADN a partir de su ARN a través de la enzima transcriptasa inversa. El genoma de ARN de los retrovirus acaba en repeticiones directas y el proceso de retrotranscripción los convierte en repeticiones terminales largas (LTR), parecidas a repeticiones invertidas de los transposones. Estas LTR permiten que el ADN lineal funcione como un transposón y se inserte en el genoma huésped.

De acuerdo a Havecker y col., (2004) el mecanismo de movilidad que realizan los diversos retrotransposones LTR es similar (Figura 6). Los retrotransposones transcriben un RNA, a partir del gen *gag* (que codifica las proteínas estructurales que forman las partículas tipo virus VLP (virus-like particle), por medio de la RNA polimerasa II codificada celularmente a partir de un promotor localizado dentro en extremo 5' LTR. El RNA es traducido en el citoplasma para originar las proteínas de la VLP y llevar a cabo la transcripción inversa y la integración. Generalmente dos moléculas de RNA se empaquetan en una VLP y subsecuentemente el RNA es copiado, de manera completa, en un cDNA a través de una reacción de transcripción inversa, que es iniciada a partir de un tRNA que se acomoda en una secuencia cercana a 5'LTR (sitio primer-binding).

Se han encontrado hasta el momento miles de copias de retroelementos, es decir TEs que se transponen a partir de RT en el genoma de los eucariotas. Entre estos elementos hay varias colecciones de aquellos que poseen LTRs (es decir, pertenecientes a las familias Ty1 *copia-like* y Ty3 *gypsy-like* de retrotransposones), éstos elementos han sido especialmente exitosos en la colonización de cromosomas de las plantas superiores y constituyen en algunas especies hasta el 80% de su genoma (Feschotte y col., 2002; Kalendar y col.,

2004). SanMiguel y Bennetzen (1998) reportan este hecho con relación a la evolución del maíz y el sorgo a partir de un ancestro común hace más de diez millones de años. Estos autores afirman que la diferencia en el tamaño de los genomas de ambas especies, determinado en picogramos por citometría de flujo (4.9 a 5.5 pg en maíz y 1.6 a 1.8 pg en sorgo) son debidas a la inserción de estos elementos transponibles a lo largo de la cadena de su ADN genómico.

Los ISTR utilizan la propiedad de los elementos repetidos en las regiones terminales de los retrotransposones de los cuales se generaron, estos elementos LTR son una herramienta muy apropiada para el estudio de la biodiversidad genética, la evolución del genoma, mutación de los genes y su expresión. Sin embargo, aún es escasa la información con la que se cuenta, respecto a la secuencia de estos retrotransposones y sus LTRs debido a la variedad con que se encuentran en los organismos, lo que en ocasiones dificulta su utilización. En un estudio realizado en el genoma de la manzana, fueron encontrados 31 diferentes genes para transcriptasa inversa (RT) en retrotransposones *Ty1-copia-like*. De esos genes, 19 mostraron extrema heterogeneidad en términos de longitud de los fragmentos, composición en pares de bases y marco de lectura abierto (Zhao y col., 2007 b).

Los elementos móviles, han modificado el genoma de los organismos a través del tiempo de diversas maneras. De modo particular en plantas y mamíferos, los retrotransposones constituyen grandes fracciones de su genoma y han dado forma tanto a sus genes como a sus genomas enteros. Debido a que sus hospederos no pueden controlar el movimiento de estos elementos, la expansión de los retrotransposones ha sido acumulativa durante la evolución de las especies. En la actualidad, estos elementos se han convertido en una herramienta útil para el estudio de los genomas y su evolución (Kazazian, 2004).

Las propiedades de los marcadores basados en secuencias de retrotransposones, o bien en los LTR que los flanquean, pueden ser usadas en combinación con otros

marcadores menos específicos para incrementar la precisión de lo que se busca. En el Cuadro 2 se muestra las características de dicho marcador molecular.

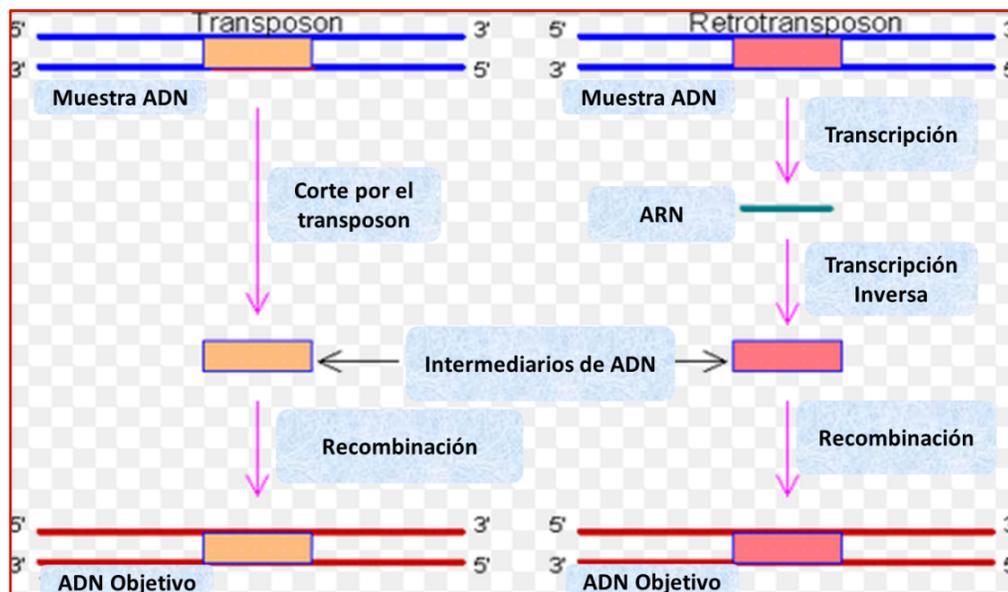


Figura 6.- Esquema de la técnica empleada en ISTRs.

Las aplicaciones prácticas de ISTRs están aparentemente centuplicadas y pueden recorrer (en el campo de las plantas) desde la determinación general de la biodiversidad, la caracterización de especies silvestres, manejo de banco de genes, estudio sobre la genética de poblaciones, huellas de variedad para su identificación siguiendo la introgresión de genes, estudios sistemáticos hasta una posible selección asistida por marcadores cosegregantes con caracteres deseables. Los ISTR pueden tener un valor potencial para identificar cruces ilegítimos, ya que permiten seguir la introgresión de loci genéticos en un material híbrido (Osorio y col., 2006).

Cuadro 2.- Comparación de marcadores moleculares.

Características	RAPD	AFLP	ISSR	ISTR
Principio	Amplificación (PCR)	Amplificación (PCR)	Amplificación (PCR)	Amplificación (PCR)
Polimorfismo	Moderado	Moderado	Moderado	Alto
Dominio	Dominante	Dominante	Dominante	Dominante
Facilidad de desarrollo	Fácil	Moderado	Fácil	Fácil
Reproducibilidad	Baja	De media a Alta	Alta	Alta
Costo	Barato	Caro	Barato	Barato

2.5 Diversidad genética en camote de cerro

Por diversidad genética se entiende la variación del genoma dentro de cada especie. Esto abarca poblaciones determinadas de la misma especie o la variación genética de una población.

La diversidad genética representa la variación heredable dentro y entre poblaciones de organismos eucariontes. Esencialmente, depende de las variaciones en la sucesión de los cuatro pares fundamentales con que se constituyen el código genético, teniendo en cuenta que en los organismos eucariontes sólo una pequeña parte (frecuentemente menos de 1%) del material genético se expresa exteriormente en la forma y en el funcionamiento del organismo.

La frecuencia de genes dentro de las poblaciones totales es la resultante de la selección natural, y a su vez, es la determinante de la evolución de las poblaciones. La importancia de la variación genética se resume diciendo: *permite los cambios evolutivos sobre la base de una reproducción selectiva* (Figura 7).

Su importancia se aprecia en la domesticación. Los agricultores y criadores de plantas y animales seleccionan de esa diversidad las características genéticas que les permiten obtener las mejores cosechas y crías.

En síntesis el mantenimiento de la diversidad importa: En el uso actual y potencial de elementos de la diversidad biológica como recursos biológicos, en el mantenimiento de la biósfera en un estado que sostiene a la vida humana y en el mantenimiento de la diversidad biológica en sí, en particular de todas las especies que viven actualmente.

Así entonces la diversidad genética puede ser clasificada de acuerdo con el manejo de la variabilidad en:

Silvestre: Las poblaciones naturales poseen un alto grado de diversidad genética garantizado por la condición silvestre de maduración de los individuos femeninos y las masculinas (por la presencia de un factor de auto incompatibilidad genética, todo lo cual promueve una reproducción cruzada o alogámica).

Cultivada: La diversidad genética de muchos organismos cultivados si bien genéricamente debe disminuir por la selección de sólo unos pocos individuos que muestran los caracteres "deseados", en muchos casos es aún mayor que aquella de las poblaciones silvestres porque es el resultado de una domesticación enriquecedora de las distintas especies y sus hibridaciones.

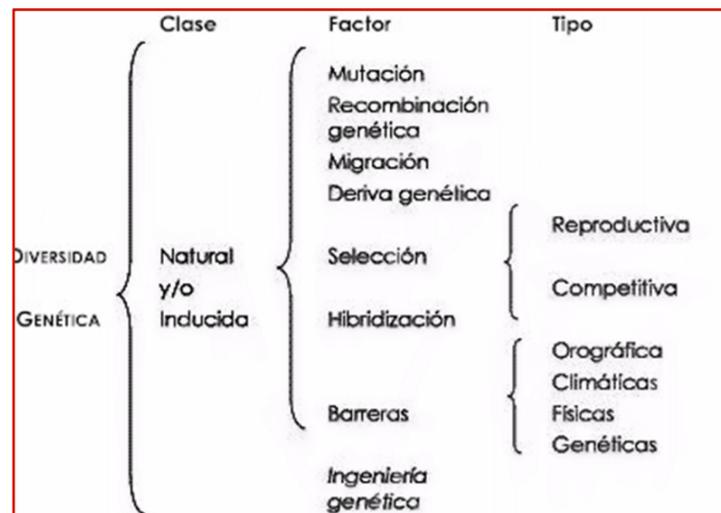


Figura 7.- Factores determinantes de la diversidad genética.

En base a lo anterior, la diversidad de *Dioscorea* (silvestre) se ve aumentada por la domesticación del cultivo en varios países (Mignouna y Dansi, 2003). No obstante el grado de diversidad genética de muchas especies de *Dioscorea* y sus relaciones genéticas aún no ha sido totalmente estudiado. Los intentos de caracterizar el camote de cerro utilizando los caracteres morfológicos (Hamon y Toure, 1990), isoenzimas (Dansi y col., 2000) y marcadores moleculares no han dado resultados concluyentes debido al alto grado de variabilidad de este cultivo (Tamiú y col., 2007).

Algunas de las más importantes variaciones morfológicas pueden ser el resultado de las diferencias en sólo unos pocos genes (Bradley y McLaughlin, 2007), observaciones que han sido apoyadas por estudios que muestran la ocurrencia de un alto grado de diversidad genética, tanto en especies de *Dioscorea* de origen silvestre como cultivadas del sur de Etiopia y especies cultivadas en África Occidental, como *D. alata*, L., *D. bulbifera* L., *D. cayenesnis* L y *D. rotundata* Poir (Tamiú y col., 2007).

En México el camote de cerro, se distribuye principalmente en Veracruz, Jalisco, Michoacán, Oaxaca, San Luis Potosí y Guanajuato. Desde tiempo precolombino estos tubérculos han sido recolectados, cocidos y consumidos como alimento por los habitantes de la región y en la actualidad, es frecuente encontrar personas que lo venden en forma cruda o cocida, debido a que esta planta no es cultivada, la gran aceptación de su tubérculo está poniendo en riesgo la diversidad genética de las zonas, por lo tanto, conocer la variabilidad genética del camote de cerro, permite apoyar estrategias de mejoramiento y conservación de este recurso fitogenético (Guizar y col., 2008).

2.6 Micropropagación *in vitro* en *Dioscorea*

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica muy utilizada en cultivos de importancia económica. Permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son

realizados por personal especializado en medios específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso para llevarlo a mayor escala de producción (Muñoz de Malajovich, 2006).

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura, ya que se utiliza en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales. Entre las ventajas de la micropropagación se pueden mencionar (Pierik, 1987): Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales, permite controlar las condiciones ambientales, debido a su independencia de los mismos (luz, temperatura y humedad controlada), permite estudiar diversos procesos fisiológicos, evita el riesgo de contaminación con patógenos, ya que se realiza en medios esterilizados, se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos, permite la obtención de individuos uniformes y facilita el transporte del material.

Dioscorea spp. se reproduce principalmente de forma vegetativa mediante el fraccionamiento de los tubérculos, siendo la principal causa de poca disponibilidad de material de siembra, ya que sólo se dispone de material silvestre debido a las personas que se encargan de colectarlo desmedidamente para su consumo. El empleo de métodos biotecnológicos para lograr volúmenes considerables de plantas seleccionadas y poder establecer plantaciones mejoradas a corto plazo, es una alternativa que debe ser más explotada en esta especie.

La micropropagación en el cultivo de *Dioscorea* ha estado dirigida, a nivel mundial, básicamente para solucionar problemas de enfermedades virales (Lebas, 2002; González, 2006). Sin embargo, los protocolos desarrollados para la micropropagación en *Dioscorea cayenensis* y *D. rotundata* se han caracterizado por el empleo de medios de cultivo semisólidos y por la utilización de frascos de

cultivo de tamaño convencional, lo cual restringe las posibilidades de la automatización de la multiplicación (Malaurie y col., 1995; Ondo y col., 2007).

Los primeros trabajos sobre micropropagación *in vitro* de *Dioscorea* con empleo de segmentos nodales fueron desarrollados a partir de la década de los años 70 por Ammirato (1976), y Mantell y Haque (1977). Posteriormente fue realizado por primera vez en el IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical) de Nigeria (Ng y Hahn, 1985) buscando la conservación *in vitro* de germoplasma de *Dioscorea*. Hanson (1986) utilizó manitol 0,2 M (3,6%) como retardante del crecimiento adicionado en el medio de cultivo, logrando con éxito la conservación *in vitro* de ápices de *D. rotundata*.

En Jalisco, se han desarrollado metodologías de micropropagación masiva, para las especies *Dioscorea sparsiflora* Helms y *Dioscorea remotiflora* (Bernabé-Antonio y col., 2012), esto para el comienzo de programas de conservación de dichas especies, así como la contribución de selección de genotipos ideales para los consumidores y la detección de variaciones genéticas existentes a nivel *in vitro* como *ex situ*.

III HIPÓTESIS

Al menos un marcador molecular: RAPD, ISSR, AFLP e ISTR puede determinar variabilidad intra e interespecífica en accesiones colectadas del género *Dioscorea* spp. en el occidente de México.

IV OBJETIVOS

4.1 Objetivo General:

Caracterizar molecularmente por medio del marcador RAPD, ISSR, AFLP e ISTR las colecciones de germoplasma de camote de cerro *Dioscorea* spp. del estado de Jalisco para evaluar la variabilidad genética intra e interpoblacional.

4.2 Objetivos Particulares:

1. Evaluar protocolos de extracción de ADN para las especies de *Dioscorea* de la región.
2. Comparación de información generada por marcadores moleculares dominantes (RAPD, ISSR, AFLP e ISTR).
3. Caracterizar molecularmente las poblaciones que se mantienen tanto *ex vitro* como *in vitro*.
4. Caracterizar morfológicamente las accesiones *ex vitro*.
5. Estimar la variabilidad intra e interespecífica encontrada a nivel molecular.

V MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Lugar de trabajo

Este trabajo se desarrolló en el Centro Universitarios de Ciencias Biológicas y Agropecuarias (CUCBA), de la Universidad de Guadalajara (U de G), ubicado en Nextipac, Jalisco. El CUCBA está situado a 20°45'N y 103° 31' O, con una altitud de 1650 m.

5.2 Colecta de material vegetal

Para la obtención del material vegetal se realizaron colectas de tubérculos de *Dioscorea* en las localidades de Acatic, Chapala, Cocula, Ixtlahuacán de los Membrillos, Ixtlahuacán del Rio, Manzanilla de la Paz, San Antonio (Chapala), San Gabriel, Zapotlanejo, Ahuacapán (Autlán), San Martín Hidalgo (Cuadro 3) (Figura 8).

Cuadro 3. Ubicación geográfica de las poblaciones colectadas para el presente trabajo.

N° correspondiente en la figura 7	Nombre de la localidad	Ubicación	Región de Jalisco	Accesiones por localidad
1	Acatic	20°52'16.1"N, 102°54'24.1"O	Altos	5
2	Chapala	20°18'24"N, 103°11'39.91"O	Ciénega	5
3	Cocula	20°28'19"N, 103°46'8.84"O	Valles	5
4	Ixtlahuacán de los Membrillos	20°21'14.5"N, 103°14'27.4"O	Centro	5
5	Ixtlahuacán del Rio	20°59'1"N, 103°11'1.94"O	Centro	12
6	Manzanilla de la Paz	20°3'16.1"N, 103°3'2.4"O	Sureste	10
7	San Antonio (Chapala)	20°19'18"N, 103°13'17.90"O	Ciénega	12
8	San Gabriel	19°43'57.04"N, 103°43'52"O	Sur	12
9	Zapotlanejo	20°33'8.6"N, 103°0'22.8"O	Centro	12
10	Ahuacapán (Autlán)	19°39'54.37"N, 104°19'26.09"O	Costa Sur	12
11	San Martin Hidalgo	20°22'16.7"N, 103°58'49.3"O	Valles	10

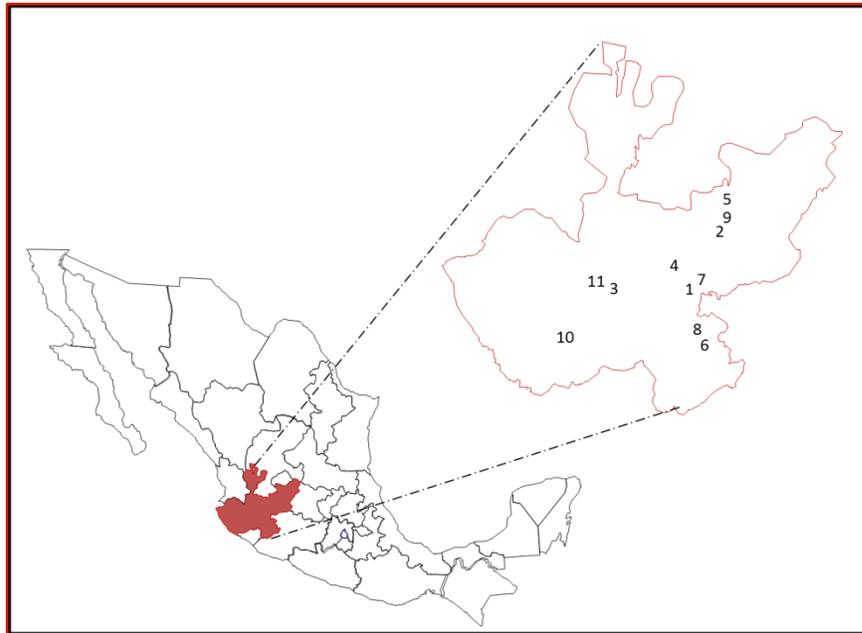


Figura 8.- Sitios de colecta de las poblaciones naturales de *Dioscorea* spp. en 11 localidades de Jalisco.

Después de la colecta en campo, el material vegetal se conservó en el laboratorio en bolsas de papel, a la sombra y a temperatura ambiente hasta la generación de brotes.

5.2.1 Establecimiento del camote de cerro en vivero

En junio de 2009, las plantas de camote de cerro fueron crecidas a partir de 200 g de segmentos de tubérculos en etapa de brotación en un sustrato formado de 30% de jal y 70% de tierra de hoja (agregando a la mezcla 2 kg de vermicomposta) sobre cajas de plástico negras de 60x40x25 cm (largo x ancho x altura) en un vivero con malla sombra al 50% ubicado en el CUCBA. A cada contenedor se le colocó rafia como tutor ya que las plantas son de hábito trepador. Antes y después del temporal de lluvias, las plantas se regaron dos veces por semana. La fertilización se llevó a cabo cada semana agregando nitrógeno, fosforo y potasio a una proporción de 20-10-20 (Scott Petters®) y una dosis de 5 g/L, aplicando 50 mL de la solución por contenedor; a partir del mes de agosto hasta noviembre, se

fertilizó una vez por mes con 5 g de nitrato de calcio granulado por contenedor. Se realizaron podas periódicas manteniendo las plantas a una altura aproximada de 2 m. Los tubérculos se cosecharon manualmente en enero de 2010.

5.2.2 Conservación y propagación del material vegetal *in vitro*

Para conservar y propagar el camote de cerro *in vitro* se utilizó material vegetal de una colección perteneciente al Laboratorio de Cultivo de Tejidos del CUCBA, proveniente de las mismas localidades de colecta del material *ex situ* (Cuadro 4).

Cuadro 4. Acciones de camote de cerro cultivadas *in vitro*.

N° correspondiente en la figura 7	Nombre de la localidad	Especie	Región de Jalisco	Acciones por localidad
1	Acatic	<i>D. remotiflora</i>	Altos	5
2	Chapala	<i>D. sparsiflora</i>	Ciénega	5
3	Cocula	<i>D. sparsiflora</i>	Valles	5
4	Ixtlahuacán de los Membrillos	<i>D. sparsiflora</i>	Centro	5
5	Ixtlahuacán del Rio	<i>D. sparsiflora</i>	Centro	5
6	Manzanilla de la Paz	<i>D. sparsiflora</i>	Sureste	5
7	San Antonio (Chapala)	<i>D. sparsiflora</i>	Ciénega	5
8	San Gabriel	<i>D. sparsiflora</i>	Sur	5
10	Ahuacapán (Autlán)	<i>D. sparsiflora</i>	Costa Sur	5
11	San Martin Hidalgo	<i>D. sparsiflora</i>	Valles	5

Se realizaron transferencias mensuales llevando a cabo la conservación del material vegetal *in vitro* por medio de proliferación de yemas axilares de la siguiente manera: se utilizaron como explantes, segmentos de brotes de cada uno de los materiales; bajo campana de flujo laminar, los explantes se transfirieron a frasco de vidrio con tapa de plástico autoclavable no hermética conteniendo 25 mL de medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) estéril con 2 mgL de cinetina (KIN) como regulador de crecimiento para inducir la brotación de yemas axilares. Los cultivos se incubaron a 27°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y una intensidad lumínica de 1500 lux.

5.3 Extracción de ADN genómico

Los trabajos de estandarización de la extracción de ADN en camote de cerro se llevaron a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Instituto de Manejo y Aprovechamiento de Recursos Fitogenéticos (IMAREFI).

Cada muestra se trabajó de manera individual. Para la extracción de ADN se probaron los métodos reportados por Keb-Llanes y col. (2002) y Cota-Sánchez y col., (2006). Las diferencias entre estos métodos de extracción fueron el ácido ascórbico, el Dodecilsulfato Sódico (SDS) y el Betamercaptoetanol (BME). El ácido ascórbico es un antioxidante que tiene la capacidad de proteger directamente a la molécula de ADN, el SDS es un detergente que rompe las paredes y membranas celulares donde es más fácil obtener el ADN y el BME reduce los enlaces disulfuro y actúa como antioxidante. Las diferencias entre ambos métodos de extracción se mencionan en el Cuadro 5.

Cuadro 5. Comparación de los métodos de extracción utilizados en este estudio.

Método reportado por Keb-Llanes y col., 2002	Método reportado Cota-Sánchez y col., 2006
Lisis celular: triturado con N ₂ líquido	Lisis celular: triturado con N ₂ líquido
Cantidad de tejido: 0.350 g	Cantidad de tejido: 0.500 g
Buffer de lisis: a base de CTAB, TRIS EDTA, BME, ac. Ascórbico, PVP y SDS	Buffer de lisis: a base de CTAB, TRIS, NaCl, EDTA, PVP
Precipitación de proteínas: en baño María a 65°C x 10 min	Precipitación de Proteínas: en baño María 55°C x 2 h
Precipitación del ADN: con isopropanol	Precipitación de ADN: con isopropanol
Lavado y precipitación de ADN: Etanol al 70%, acetato de potasio 5M	Lavado y precipitación de ADN: Etanol al 70%, acetato de sodio 3M
Resuspensión del ADN: en T.E 100 µL	Resuspensión del ADN: en T.E 100 µL
Almacenamiento: a -20°C	Almacenamiento: a -20°C

Se realizaron dos repeticiones de la extracción con cada método y posteriormente se verificó la calidad y la concentración de ADN obtenido, utilizando los métodos de electroforesis en gel de agarosa al 1% y espectrofotometría con lecturas de absorbancia a 240, 260 y 280 nm; donde la lectura a 240 nm mide concentración

de carbohidratos mientras que la relación entre las lecturas 260 y 280 nm estiman la calidad de ADN. Se aplicó la siguiente fórmula para determinar la concentración a partir de las lecturas de espectrofotómetro:

$$ConcADN \left(\frac{\mu g}{\mu L} \right) = [DO_{260} \times factor \text{ dilución} \times 50 \mu g/ml] / 1000$$

Donde el factor dilución fue 1:100 y el término 50 µg/mL es debido a que una densidad óptica a 260 nm, (DO₂₆₀)=1 corresponde a una concentración de 50 microgramos (µg) por microlitro (µL) de ADN.

Con las lecturas espectrofotométricas obtenidas de cada muestra, se hizo una comparación estadística, consistente en un análisis de varianza y análisis de diferencia mínima significativa utilizando el programa estadístico Statgraphics.

5.4 Pruebas de eficiencia de marcadores moleculares dominantes.

El análisis del genoma vegetal, usando marcadores moleculares dominantes, no permite discriminar entre homocigotos dominantes y heterocigotos para un loci particular, por lo que la estimación de las frecuencias alélicas que permiten los estudios de diversidad genética, se debe hacer de manera indirecta, asumiendo equilibrio de Hardy-Weinberg.

Para el inicio de un estudio de diagnóstico, cuando no se cuenta con información de marcadores codominantes, que pueden permitir el conteo directo de heterocigotos, una estrategia accesible, son los marcadores aleatorios dominantes, que basan su detección en secuencias azarosas del genoma (RAPDs, AFLPs), o bien en secuencias relativas a regiones particulares pero que no han sido secuenciadas completamente (ISTRs, ISSRs). Actualmente, se cuenta con reportes de comparación del uso de marcadores codominantes y dominantes, que indican la confiabilidad de éstos últimos en la determinación de variabilidad y diversidad genética (Aagaard y col., 1997; Sarwat y col., 2008).

En el presente trabajo se utilizaron marcadores dominantes para determinar la eficiencia de los mismos en la detección de polimorfismo y por ende, variabilidad genética en camote de cerro.

5.4.1 Detección de los marcadores RAPD por medio de la amplificación por PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen final de mezcla de reacción de 25 μ L, la cual contenía regulador PCR 1X, $MgCl_2$ 10 mM, 1.5 μ M de cada cebador, dNTPs 0.5 mM, 2 ng de muestra de ADN y 0.1 U de Taq Polimerasa Promega®.

La amplificación del ADN se hizo utilizando el termociclador de marca TECHNE con capacidad para 96 muestras. El estudio se realizó utilizando los cebadores seleccionados previamente (Cuadro 6). El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa, consistió en un ciclo de desnaturalización de 3 min a 94 °C, seguido de 45 ciclos de 1 min a 94 °C (desnaturalización del ADN), 2 min a 36 °C (alineamiento del cebador al ADN) y 2 min a 72 °C (extensión de fragmento de ADN), luego un periodo de extensión de 10 min a 72 °C. Finalmente las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C.

Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa al 1.5% y visualizados con luz ultravioleta utilizando tinción con bromuro de etidio.

5.4.2 Detección de los marcadores ISSR por medio de la amplificación por PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen final de mezcla de reacción de 20 μ L, la cual contenía regulador PCR 1X, $MgCl_2$ 2.5 mM, 0.8 μ M de cada cebador, dNTPs 0.25 mM, 4 ng de muestra de ADN y 0.05 U de Taq Polimerasa Promega®.

La amplificación del ADN se hizo utilizando el termociclador de marca TECHNE con capacidad para 96 muestras. El estudio se realizó utilizando los cebadores seleccionados previamente (Cuadro 6). El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa, consistió en un ciclo de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 45 s a 95 °C (desnaturalización del ADN), 45 s a 52 °C (alineamiento del primer al ADN) y 1 min 30 s a 72 °C (extensión de fragmento de ADN), luego un periodo de extensión de 10 min a 72 °C. Finalmente las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C. Los productos de amplificación fueron separados en geles de agarosa de alta resolución (BIO-RAD®) al 1.3% y visualizados con luz ultravioleta utilizando tinción con bromuro de etidio.

5.4.3 Detección de los marcadores AFLP por medio de la amplificación por PCR

Para la aplicación de la técnica de AFLPs utilizamos un kit (Invitrogen, Life Technologies, Kit de AFLP® Ligación y preselective de amplificación para los genomas de plantas).

Este marcador requiere un ADN genómico altamente puro (300 ng), el cual se digirió simultáneamente con 2.5 unidades de *EcoRI* y *MseI*, cada uno en un buffer de reacción 5X (Tris HCl 50 mM, pH 7.5, 50 mM de Mg-acetato, 250 mM de K-acetato) en un volumen de reacción de 25 µL se incubaba a 37 °C durante cuatro horas, después se realizó la ligación de adaptadores de *EcoRI* y *MseI*. El adaptador de ADN-ligado se diluyó y se pre-amplificó utilizando los cebadores específicos a los del adaptador con una adición selectiva de nucleótidos en el extremo 3' (cebador *MseI* adaptador específico + C; *EcoRI*-cebador específico de adaptador + A) (Cuadro 6). La preamplificación se llevó a cabo durante 20 ciclos, cada ciclo consistió en desnaturalización a 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 60 s, y 72 °C durante 60 s. El ADN preamplificado se diluyó 50 veces con agua estéril y se utilizó como una plantilla para la amplificación selectiva utilizando cebadores *EcoRI* y *MseI* con tres nucleótidos selectivos en el extremo 3' (*EcoRI* + 3 N y *MseI* + 3 N). Los parámetros de los ciclos para la PCR consistieron en desnaturalización

a 94 °C durante 30 s, a 68 °C durante 30 s y 72 °C durante 30 s, seguido de un protocolo de ciclos de toma de contacto en el que la temperatura de hibridación se redujo en 1 °C en cada ciclo. Este procedimiento se continuó hasta que la temperatura de alineación alcanzó 56 °C. Por último, la amplificación se llevó a cabo durante 23 ciclos a 94 °C durante 30 s, 56 °C durante 30 s, y 72 °C durante 60 s.

Los productos amplificados se separaron mediante geles de poliacrilamida 6% de acuerdo con Sambrook y Russell (2001). Después de la electroforesis, los geles se levantaron sobre papel cromatográfico, cubiertos con una envoltura de plástico, secados al vacío y las bandas se visualizaron por exposición en una película X-Omat Kodak por diferentes periodos que oscilan entre uno o varios días.

5.4.4 Detección de los marcadores ISTR por medio de la amplificación por PCR

Para la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó un volumen final de mezcla de reacción de 20 µL, la cual contenía regulador PCR 1X, MgCl₂ 3 mM, 0.3 µM de cada cebador, dNTPs 0.25 mM, 4 ng de muestra de ADN y 0.025 U de Taq Polimerasa Promega®.

La amplificación del ADN se hizo utilizando el termociclador de marca TECHNE con capacidad para 96 muestras. El estudio se realizó utilizando los cebadores seleccionados previamente (Cuadro 6). El programa utilizado para la reacción en cadena de la polimerasa, consistió en un ciclo de desnaturalización de 3 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 95 °C (desnaturalización del ADN), 1 min a 45 °C (alineamiento del primer al ADN) y 2 min a 72 °C (extensión de fragmento de ADN), luego un periodo de extensión de 10 min a 72 °C. Finalmente las muestras se mantuvieron a una temperatura de 4 °C.

Los productos de amplificación fueron separados en electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con sales de plata según el protocolo de Osorio y col. (2006).

Cuadro 6. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

Marcador Molecular	Cebador	Secuencia
RAPD	1	GGTGCGGGAA
	2	GTTTCGCTCC
	3	GTAGACCCGT
	4	AAGAGCCCGT
	5	AACGCGCAAC
	6	ACGTGGAATG
ISSR	855	(AC)8(CT)C
	864	(ATG)6
	890	ACGACTACG(GT)7
	812	(GA)8
	888	BDB(CA)7
ISTR	891	HVH(TG)7
	F31/B31	GTCGACATGCCATCTTTC-F ATTCCCATCTGCACCATT-R
	F91/B1	ATATGGACTTAAGCAAGCCA-F ATCAGGAAGGTCTGTAAAGC-R
AFLP	F10/B1	ATATATGGACTTAAGCAAGCA-F ATACCTTTCAGGGGGATG-R
	AAC+CTA	GATGAGTCCTGAGTAACAG GATGAGTCCTGAGTCGTA CC
	AAC+CAA	GATGAGTCCTGAGTAACAG GACTGCGTACCAATTAC T

5.5 Análisis de datos moleculares

Se estimaron varios parámetros para evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR donde se calculó el contenido de información polimórfica (PIC) usando la fórmula de Roldán-Ruiz y col. (2000), $PIC = 2f_i(1 - f_i)$ donde f_i es la frecuencia de alelo amplificado y $1 - f_i$ es la frecuencia de alelo nulo. La heterocigosidad por locus fue calculada de acuerdo a la formula $H_e = 1 - p^2 - q^2$ donde $p^2 = f_i$. El promedio de heterocigosidad para cada marcador fue calculada basado en $H_{av} = \sum H_e / L$ donde L = al total de bandas detectadas. La relación Múltiplex fue calculada $MR = L / T$ donde T = es el número de combinación de cebadores. El índice del marcador (MI) se obtuvo multiplicando el promedio de heterocigosidad por el Multiplex ratio: $MI = H_{av} \times MR$.

Se identificó el número de bandas polimórficas en los geles obtenidos, con las cuales se obtuvieron las matrices de presencia/ausencia para cada combinación de cebadores. Para calcular la similitud entre los materiales utilizados, se usó el coeficiente de Jaccard, estimado como $S_j = V_{ij}/(v_{ij}+W_{ij}+X_{ij})$ donde v_{ij} se refiere las bandas en común entre dos unidades taxonómicas operacionales i y j ; w_{ij} es el número de bandas presentes en i y ausentes en j ; y x_{ij} es el número de bandas presentes en j y ausentes en i . Cabe mencionar que este coeficiente mide la proporción de bandas entre dos unidades taxonómicas, excluyendo aquellas ausentes en ambas unidades (Reif y col., 2004). Se realizó el análisis de agrupamiento por el método UPGMA (Unweighted Paired Group Method Using Arithmetic Averages) (Reif y col., 2004) contenido en el programa NTSYS 2.21 (Rohlf, 2009) reportando los resultados de manera gráfica en un dendrograma.

Se determinó la estructura genética de las poblaciones usando el programa STRUCTURE versión 2 (Pritchard y col., 2000). Estos autores proponen el uso de modelos Bayesianos basados en el análisis de agrupamiento; uno de los aspectos más relevantes en este tipo de estrategias, es en el análisis y definición de grupos y la ubicación de cada uno de los individuos de dichos grupos. Aun cuando la implementación de los métodos de cómputo ha sido muy compleja, el principio es relativamente sencillo.

Suponiendo que todos los individuos son parte de K poblaciones y representando las frecuencias genotípicas de las poblaciones K por y_k entonces la probabilidad del individuo i provenga a la población k que será:

$$P\left(\frac{i}{k}\right) = P\left(\frac{x_i}{y_k}\right) / \sum_k P\left(\frac{x_i}{y_k}\right)$$

En donde x_i se refiere a los datos correspondientes al individuo i . Si asignamos las probabilidades para y_k , es posible entonces calcular las probabilidades posteriores con base en métodos Bayesianos, de que el individuo i pertenezca al grupo k . Este método permite que los individuos puedan ser producto de una mezcla entre dos o más poblaciones. Esta aproximación metodológica usa métodos de Montecarlo para estimar las frecuencias alélicas de cada una de las

poblaciones (K) y la proporción del genoma de cada individuo respecto a las diferentes poblaciones (qK).

Los valores de diferenciación genética se obtuvieron en términos de frecuencias alélicas, estos valores van de 0 a 1 y a continuación se describe la interpretación de los mismos: 0 = no diferenciación <0.05 = diferenciación pequeña 0.05 < y < 0.15 = diferenciación moderada, 0.15 < y < 0.25 = diferenciación grande, > 0.25 = diferenciación muy grande, 1= fijación de alelos alternativos en diferentes poblaciones o subpoblaciones (IPGRI, 2003).

Se realizó un análisis de correspondencia de matrices de similitud, basado en la prueba de Mantel de los marcadores RAPD, ISSR, AFLP e ISTR. Esta prueba evalúa la correlación entre las matrices de distancia; la significancia estadística de esta asociación se mide por un procedimiento de asignación al azar en la que el orden de los elementos en una de estas matrices son permutados (Manly, 1997). La prueba de correspondencia entre los diferentes marcadores se realizaron sobre la base de 10,000 repeticiones al azar, utilizando el módulo de MXCOMP del software NTSYS versión 2.21 (Rohlf, 2009).

5.6 Caracterización morfológica

Las mediciones de los caracteres morfológicos se llevaron a cabo en 100 accesiones pertenecientes a las localidades señaladas en el Cuadro 3, estas accesiones son las mismas que se usaron en los análisis moleculares. Los caracteres fueron medidos de acuerdo al IPGRI, en donde fueron medidas las características del tallo maduro, hojas maduras, floración, formación, desarrollo y posición del fruto y sexo de la planta.

Para la caracterización morfológica de estos 100 individuos se midieron 32 variables recomendadas por Castillo (2007):

Caracteres para hoja:

- Posición de las hojas maduras

- Color de las hojas maduras
- Color de las nervadura de las hoja
- Color del borde de la hoja
- Pilosidad en el haz de la hoja madura
- Pilosidad en el envés de la hoja
- Forma de la hoja
- Forma del ápice de la hoja madura
- Distancia entre lóbulos de la hoja
- Posición más ancha de la hoja madura
- Color de la punta de la hoja
- Pilosidad del peciolo de la hoja

Caracteres para flor:

- Floración
- Posición de la inflorescencia
- Tipo de inflorescencia
- Color de la flor
- Sexo de la planta
- Días hasta floración después del brote
- Número de inflorescencia p/planta
- Longitud media de la inflorescencia

Caracteres para el fruto:

- Formación del fruto
- Desarrollo del fruto
- Posición del fruto
- Forma del fruto
- Pilosidad del fruto
- Ausencia/Presencia de semillas en el fruto
- Forma de la semilla
- Estructura del ala de la semilla

Caracteres para tallo:

- Altura del tallo maduro
- Diámetro del tallo maduro en cm

Caracteres para tubérculo:

- Peso del tubérculo
- Largo del tubérculo

La información derivada del análisis fenotípico de la planta, así como de los caracteres tanto cuantitativos como cualitativos con las 32 variables, se sometió a un análisis de agrupamiento con base en el programa NTSYS versión 2.21 (Rohlf, 2009). Adicionalmente se realizó un análisis de componentes principales (CP) contenido en el mismo paquete estadístico NTSYS versión 2.21, esto para determinar las características que tienen mayor valor descriptivo y que mejor explican la variabilidad de la planta.

5.7 Identificación taxonómica

Antes de completar el desarrollo fisiológico de las 100 accesiones, en el vivero malla sombra, hojas, tallos e inflorescencias fueron herborizadas y se trasladaron al herbario IBUG (Instituto de Botánica de la Universidad de Guadalajara), e identificadas por el biólogo Arturo Castro Castro. La clasificación taxonómica de las plantas que completaron su ciclo hasta la floración, se realizó en los años 2010 y 2011; se cortaron flores masculinas y femeninas, a partir de las cuales fueron identificadas las especies.

VI RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Comparación de protocolos de extracción de ADN en especies de *Dioscorea*

Las metodologías de extracción de ADN descritas fueron rápidas y sencillas. De acuerdo con la comparación de protocolos de extracción, en la Figura 9 se muestra la imagen de un gel de agarosa al 1% con los productos de extracción de los métodos utilizados. En ambos casos se muestra presencia de ADN. En las muestras obtenidas con el método de Cota-Sánchez, se presentan algunos contaminantes que no permiten considerar una calidad óptima del ADN; esto se indica por el cociente obtenido de los datos de Densidad Óptica ya que ninguno se encuentra entre los valores de 1.8 y 2.0 reportados como valores óptimos para pureza (Valadez y Kahl, 2000).

Método de Keb-Llanes y col., 2002 Método de Cota-Sánchez y col., 2006

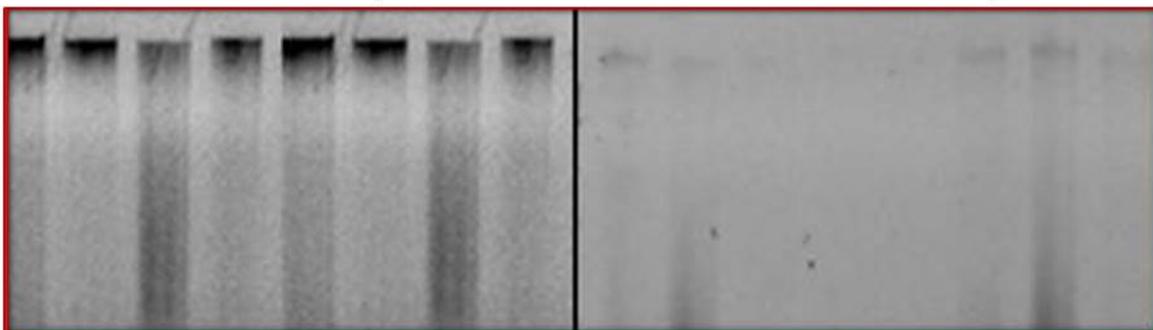


Figura 9.- Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Resultados obtenidos con el método reportado por Keb-Llanes y el método reportado por Cota-Sánchez.

El análisis de varianza mostró diferencias significativas para concentración de ADN (DO_{260}) así como también en presencia de proteínas (Cuadro 7). La prueba de diferencia mínima significativa (LSD) (Cuadro 8) señaló la significancia a favor del método Keb-Llanes y col. (2002) para parámetros de calidad, es decir Densidad Óptica a 280 nm. Debido a lo anterior, se eligió dicho método para realizar las extracciones del ADN que se utilizó en el presente trabajo. La calidad con que se obtuvieron los extractos de ADN, fue suficiente para realizar las diluciones recomendadas para los protocolos de PCR de los marcadores utilizados. Las lecturas espectrofotométricas de estas muestras fluctuaron entre

1130 y 283 ng/uL. Tanto RAPD, ISSR, AFLP como ISTR requieren una concentración de 50 ng/μL.

Cuadro 7.- Resumen de análisis de varianza para parámetros de calidad de ADN.

Indicador	F	P	Variable
DO 240 nm	0.29	0.5953	Carbohidratos
DO 260 nm	8.84	0.0043**	Conc. de ADN
DO 280 nm	15.97	0.0020**	Proteínas

**Altamente significativo
DO = Densidad óptica

Cuadro 8.- Prueba de diferencia mínima significativa para parámetros de calidad de ADN.

PRUEBA LSD	F	P
Media DO280 con Keb-Llanes	0.0228	A
Media DO280 con Cota-Sánchez	0.0797	B

Prueba LSD, letras iguales significan medias iguales
Diferencia mínima significativa (P<0.05)

6.2 Comparación de información generada por los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR

Para evaluar la eficiencia de los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR se realizó un experimento utilizando 24 materiales *ex vitro* de camote de cerro (Cuadro 9).

Cuadro 9.- Acciones de *Dioscorea* utilizadas en la comparación de marcadores moleculares.

No.	Nombre de la localidad	Código	Nombre Científico	Región de Jalisco
1	Chapala	Ch3	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
2	Chapala	Ch4	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
3	Chapala	Ch6	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
4	Chapala	Ch7	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
5	San Antonio	SA3	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
6	San Antonio	SA5	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Ciénega
7	Cocula	CO1	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
8	Ahualulco	Ah1	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Valle
9	Ahualulco	Ah3	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Valle
10	Ixtlahuacán de los Membrillos	Ce1	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
11	Ixtlahuacán de los Membrillos	Ce2	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
12	La Manzanilla de la Paz	LaM1	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sureste
13	La Manzanilla de la Paz	LaM2	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sureste
14	Acatic	A2	<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth	Altos
15	Acatic	A3	<i>Dioscorea remotiflora</i> Kunth	Altos
16	Ixtlahuacán del Río	IR2	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
17	Ixtlahuacán del Río	IR3	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
18	Ixtlahuacán del Río	IR6	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Centro
19	San Gabriel	Te1	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur
20	San Gabriel	Te2	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur
21	San Gabriel	Te3	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur
22	San Gabriel	Te4	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur
23	San Gabriel	Te5	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur
24	San Gabriel	Te6	<i>Dioscorea sparsiflora</i> Helms	Sur

Todos los marcadores moleculares utilizados se basan en secuencias aleatorias e implican diferentes niveles de dificultad técnica, los diferentes números de cebadores y sus secuencias se reportan en el Cuadro 6.

Se detectaron diferentes patrones de bandas polimórficas con cada uno de los marcadores moleculares utilizados (Figura 10). De acuerdo a la estimación de varios parámetros para evaluar la eficiencia de los marcadores aplicados se detectó diferencia con los loci detectados por cada uno de los marcadores moleculares (Cuadro 10).

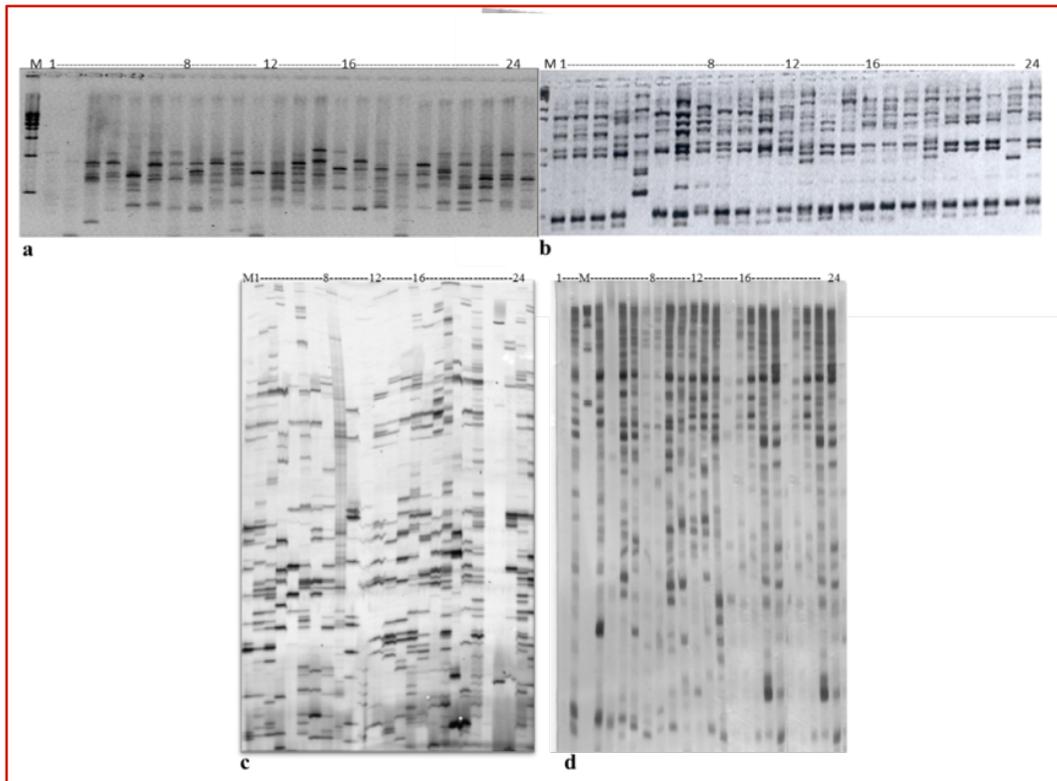


Figura 10.- Patrones de bandas en geles con cuatro marcadores moleculares que muestran polimorfismo en *Dioscorea* spp. (a) RAPD, (b) ISSR, (c) AFLP (d) ISTR. M: Marcador de peso molecular, las localidades 1-8 Chapala, San Antonio, Ahualulco, 9-12 de Ahualulco, Ixtlahuacán de los Membrillos, La Manzanilla de la Paz, 13-16 de La Manzanilla de la Paz, Acatic, Ixtlahuacán del Río, 17 - 24 Ixtlahuacán del Río, San Gabriel.

Cuadro 10.- Comparación de los marcadores moleculares RAPD, ISSR, AFLP e ISTR evaluando diversidad genética en materiales *ex vitro* en *Dioscorea* spp.

Parámetros para medir eficiencia en cada marcador	RAPD	ISSR	AFLP	ISTR
Número de individuos	24	24	24	24
Total número de bandas (<i>L</i>)	302	155	108	92
Bandas Polimórficas (<i>p</i>)	158	127	88	79
Número total de cebadores (<i>T</i>)	6	6	2	3
Multiplex ratio (MR) (<i>L/T</i>)	50.33	25.83	54	30.66
Porcentaje de Polimorfismo (% <i>p</i>)	58.27	81.93	81.48	85.86
Contenido de Información Polimórfica (PIC)	0.44	0.49	0.48	0.47
Promedio de Heterocigosidad (<i>Hav</i>)	0.43	0.45	0.47	0.36
Índice del Marcador (MI) = <i>Hav</i> x MR	21.6	11.62	25.38	11.03

Se produjeron entre 92 y 302 bandas totales por marcador molecular en donde RAPD mostró el mayor número. De acuerdo al Contenido de Información Polimórfica (PIC), la diversidad fue equivalente para todos los marcadores. Los cuatro marcadores utilizados fueron informativos con PIC de 0.49 para ISSR y 0.44 para RAPD. El promedio de heterocigosidad esperada fue mayor en AFLP y el más bajo para ISTR; en cambio se obtuvieron resultados diferentes para MI donde se observó el índice de marcador más alto para AFLP (25.38) y el más bajo para ISTR (11.03). Con respecto a la diversidad, estos resultados muestran que cualquiera de los marcadores utilizados pueden ser considerados para evaluar diversidad genética en accesiones de *Dioscorea* spp.

Se llevó a cabo un análisis de agrupamiento para cada marcador, en donde cada uno de ellos muestra una correspondencia entre la similitud de individuos (Figura 11). Cada marcador detectó una similitud de 0.15 a 1.00 entre los individuos según el coeficiente de Jaccard's. Los marcadores AFLP e ISSR detectaron seis grupos por accesiones de la misma región, mientras que RAPD e ISTR detectaron cinco grupos.

Según los resultados los individuos de Acatic (A2 y A3) mostraron alta similitud al igual que las accesiones de Tepozal (Te) Ixtlahuacán del Río (IR) cuando se analizó con AFLP, RAPD e ISSR.

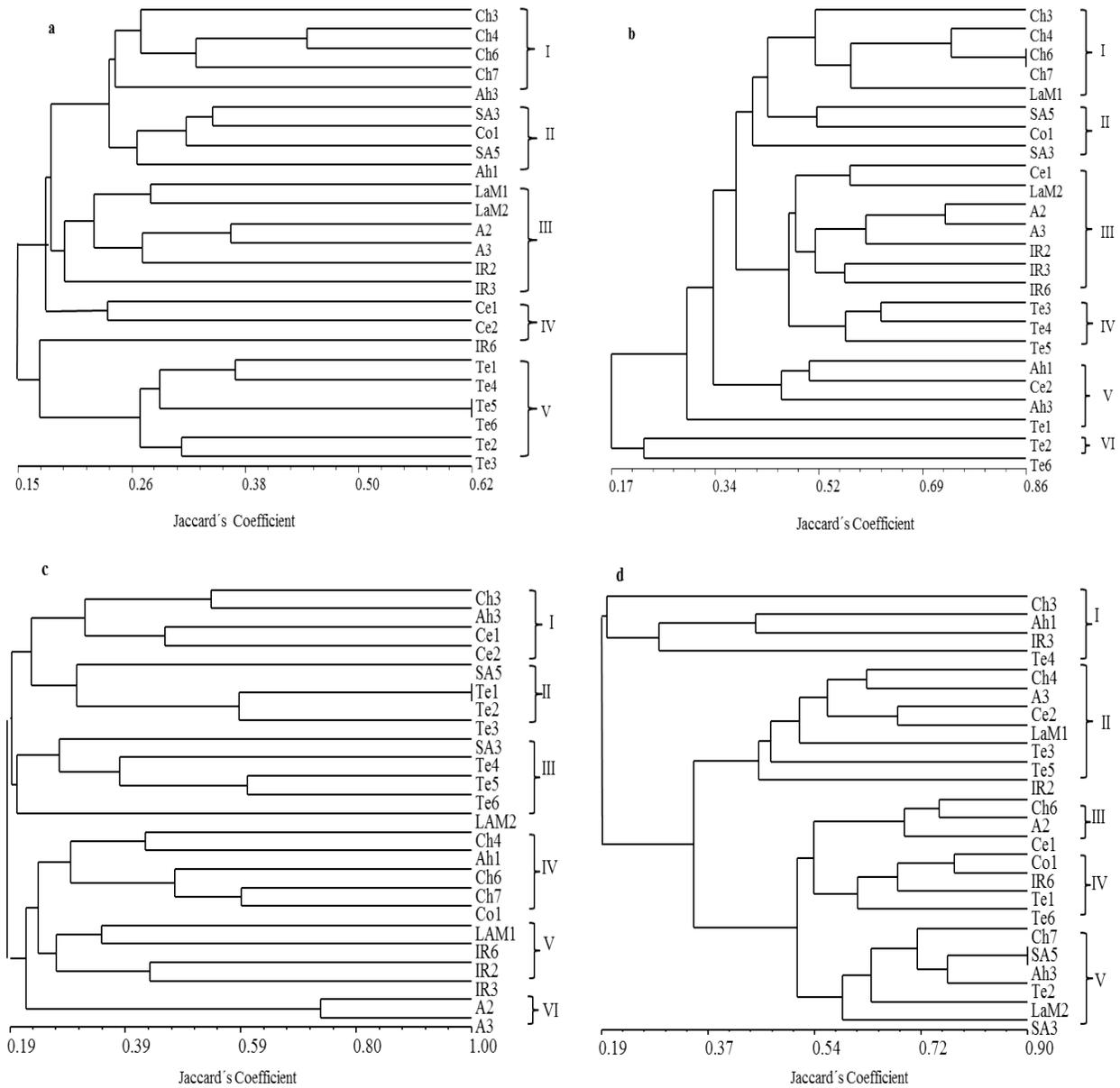


Figura 11.- Comparación de relaciones genéticas entre genotipos de *Dioscorea* revelados por a) RAPD, b) ISSR, c) AFLP d) ISTR.

Un análisis global se llevó a cabo utilizando las bandas totales producidas para todos los marcadores (Figura 12). Se detectaron cuatro grupos en estos análisis. Vale la pena señalar que dos individuos (CH3 y Ah1) se colocaron en el grupo I, estas plantas se colectaron a partir de diferentes regiones (Ciénega y Valles), en donde la similitud entre ellas es baja (0.2384, según el coeficiente de Jaccard), en comparación con la máxima similitud encontrado en otros materiales (C6 y C7), que es 0.58.

Se formaron tres grupos con individuos con origen geográfico común Chapala, San Antonio, Cocula, Ahualulco, Cedros, La Manzanilla de la Paz, Acatic Ixtlahuacan del Río y Tepozal (II, III y IV) y similitudes medio de ≈ 0.322 . Los valores de bootstrap lo muestran en la Figura 12. Los únicos dos materiales pertenecientes a *D. remotiflora* se agruparon en el tercer grupo (III), en base a una similitud de 0.34165 con LaM2 y 0.3196 con respecto a la IR2, IR3 e IR6.

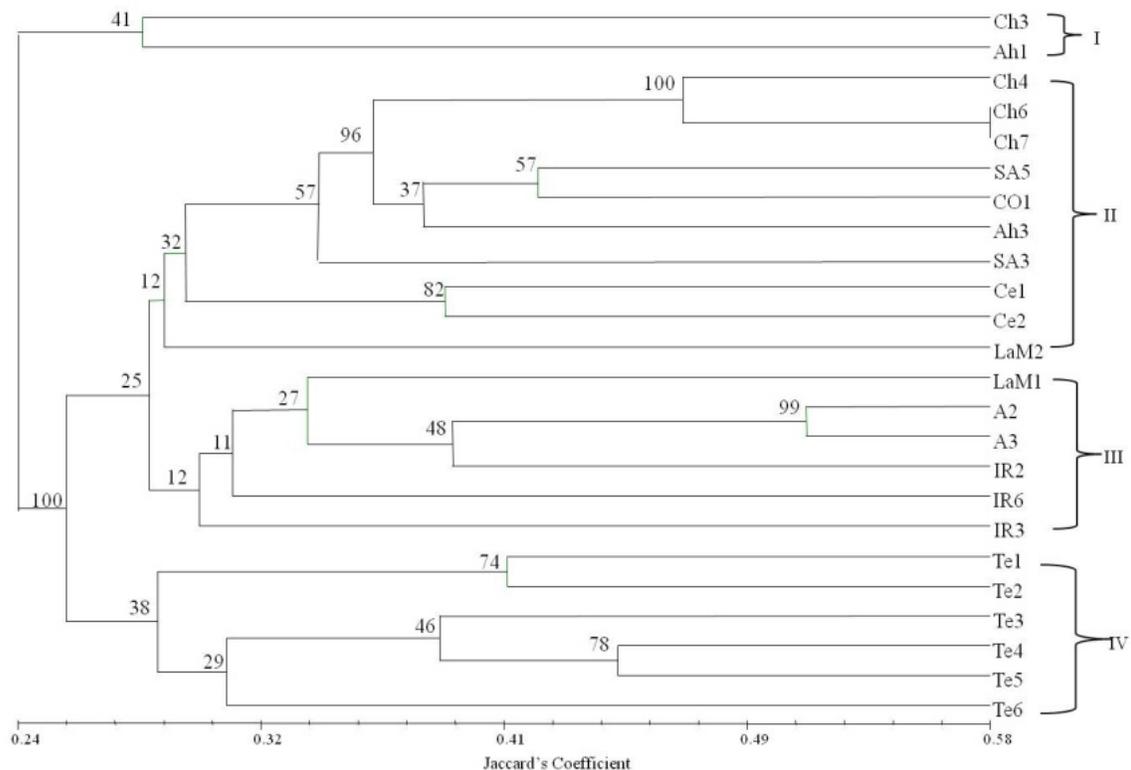


Figura 12.- Análisis de agrupamiento y bootstrap para 24 individuos de *Dioscorea* spp basado en marcadores moleculares.

Con el fin de determinar la correlación entre las matrices de similitud de los marcadores moleculares, se llevó a cabo una prueba de Mantel para obtener el grado de relación entre ellos; como referencia, se utilizó una matriz de similitud incluyendo la información de todos los marcadores. Las matrices de similitud se basaron en el coeficiente de Jaccard.

Los resultados de la correlación entre los coeficientes r con respecto a las matrices de similitud se presentan en el Cuadro 11. Los valores de r no fueron significativos y oscilaron entre -0.06288 entre ISSR y ISTR a 0.3172 entre AFLP y RAPD. Las correlaciones entre los sistemas de marcadores con respecto a la combinación de marcadores fueron mayores, que van de 0.48288 (AFLP) de 0.66821 (RAPD). Basándose en los resultados de la prueba de Mantel (Cuadro 11) y el índice de marcador que implica heterocigosidad media y la relación de múltiplex (Cuadro 10), Los sistemas de marcadores más eficientes para la detección de diferencias genéticas entre las accesiones de *Dioscorea spp.* fueron RAPD y AFLP.

Cuadro 11.- Correlación de las matrices de similitud derivados de RAPD, ISSR, AFLP e ISTR.

	RAPD	ISSR	AFLP	ISTR	TODOS*
RAPD	1				
ISSR	0.24575	1			
AFLP	0.31720	0.12418	1		
ISTR	0.14620	-0.062288	0.10157	1	
Agrupamiento*	0.66821	0.57112	0.59068	0.48288	1

*Análisis de combinación de todos los marcadores

Los patrones de agrupamiento en base a los diferentes sistemas de marcadores se relacionaron principalmente con la localidad de las accesiones. Estos resultados apoyan el hecho de que existen variaciones específicas de la región, lo que se explica por un proceso de adaptación a largo plazo para el suelo, clima, varias generaciones de selección y la sobreexplotación (Mostul y Cházaro, 1996).

En las localidades en las que se colectaron las muestras, sólo se encontraron dos especies del género *Dioscorea* (*D.sparsiflora* y *D.remotiflora*). Estas no se separan claramente en el análisis de agrupamiento debido a que morfológicamente ambas especies son muy similares (Mc Vaugh, 1989). Las diferencias dentro de los individuos en una población de *Dioscorea* spp. se había reportado anteriormente (Dansi y col., 2000; Mignouna y col., 2002).

El mantenimiento de la diversidad genética dentro de una especie de plantas se ha demostrado que puede ser influenciado por sus características biológicas y *Dioscorea* spp. ha demostrado que así es, al incluir las plantas de diferente sexo, diferentes niveles de ploidía (Arnau y col., 2009) , el sistema de apareamiento y la distribución geográfica (Mao-Feng y col., 2010) .

Los cuatro sistemas de marcadores utilizados, son una herramienta reproducible para detectar relaciones entre los materiales de *Dioscorea* spp. Para identificar la asociación entre la similitud genética y distribución geográfica, así como estimar la diversidad genética. Sin embargo, una mayor eficiencia se encuentra en RAPD y AFLP.

Las bajas correlaciones entre los diferentes sistemas de marcadores moleculares muestran la importancia de utilizar diferentes marcadores para la estimación de la diversidad y la similitud genética, por lo tanto, es importante hacer hincapié en que la complementariedad de la información que se genera por diferentes marcadores es valiosa para los estudios genéticos que involucran tanto, la diversidad y relaciones. El uso de un conjunto de datos combinados con al menos dos de los marcadores es lo ideal (Jhang y col., 2010).

6.3 Determinación de variación intra e interespecífica en poblaciones *ex vitro* e *in vitro* utilizando el marcador molecular ISTR

Se eligió utilizar el marcador molecular ISTR para caracterizar las poblaciones que se mantienen tanto *ex vitro* como *in vitro* para generar información en las especies de *Dioscorea* de acuerdo a la detección de polimorfismo asociado a la inserción de retrotransposones en el genoma, que no requiere ADN puro, no se necesita saber el genoma de la especie, es una técnica barata y de alta reproducibilidad.

A partir de la aplicación de la técnica PCR en la que se basa el marcador molecular, se elaboraron los geles para separar los patrones de amplificación de los materiales *ex vitro*, estos patrones fueron diferentes para cada combinación de cebadores utilizados. Estas diferencias fueron perceptibles a simple vista en los geles (Figura 13).

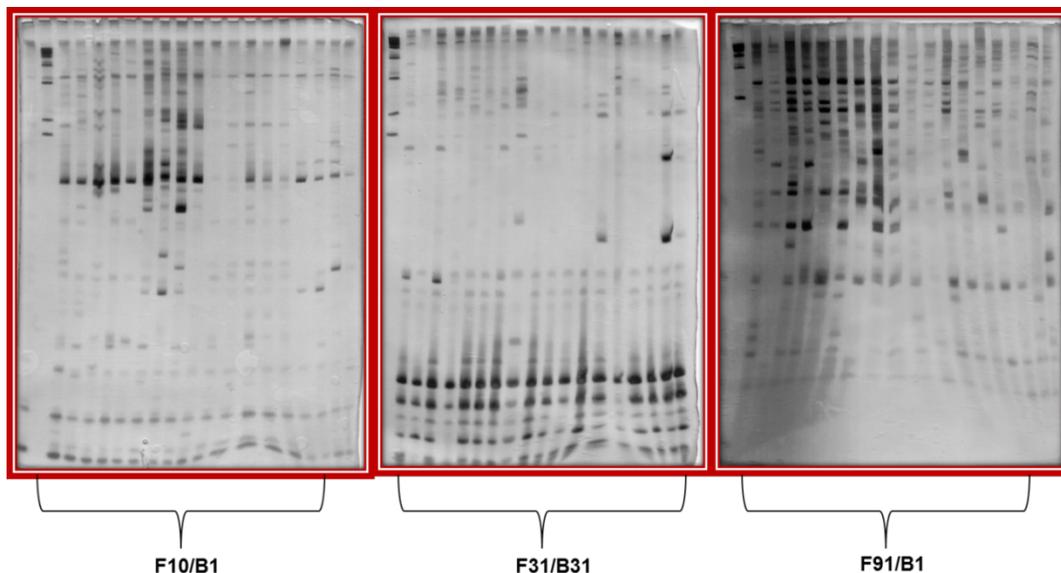


Figura 13.- Patrones de amplificación con tres combinaciones de cebadores para el marcador ISTR. Muestras *ex vitro*.

Se produjeron un total de 79 bandas (loci) con las tres combinaciones de cebadores, el porcentaje de polimorfismo detectado fue diferente para cada combinación de cebador y se reportan los valores en el Cuadro 12.

Cuadro 12.- Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con tres combinaciones de cebadores de ISTR en accesiones de *Dioscorea* spp *ex vitro*.

Iniciadores	Total de bandas producidas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de Polimorfismo
F10/B1	25	21	84.00
F31/B31	24	14	58.33
F91/B1	30	29	96.66
TOTAL	79	64	81.01

El mayor porcentaje de polimorfismo se detectó mediante la combinación F91/B1. No se cuenta con referencias de la utilización de este marcador en la misma especie, sin embargo, este porcentaje es mayor a lo reportado por Castellanos (2011) en *Phaseolus vulgaris* quién utilizó el mismo marcador molecular y la misma combinación de cebadores, y reportó de igual manera el mayor porcentaje de polimorfismo con esta combinación. Sin embargo, en la especie *Dioscorea* spp, se obtuvo un mayor número de loci detectados.

Según lo mencionado por Sánchez (2006), el polimorfismo representa las diferencias entre individuos, detectados con un marcador en particular, por lo que el polimorfismo que se encontró con el marcador ISTR en este trabajo, puede calificarse como una herramienta confiable para encontrar diferencias a nivel individual.

Con los geles obtenidos de las muestras *in vitro* también fueron notorias las diferencias ente los patrones de amplificación para cada cebador (Figura 14). Produjeron un total de 79 bandas (loci), el mayor porcentaje de polimorfismo en este caso, al igual que los materiales *ex vitro* fue la combinación F91/B1 como lo muestra el Cuadro 12.

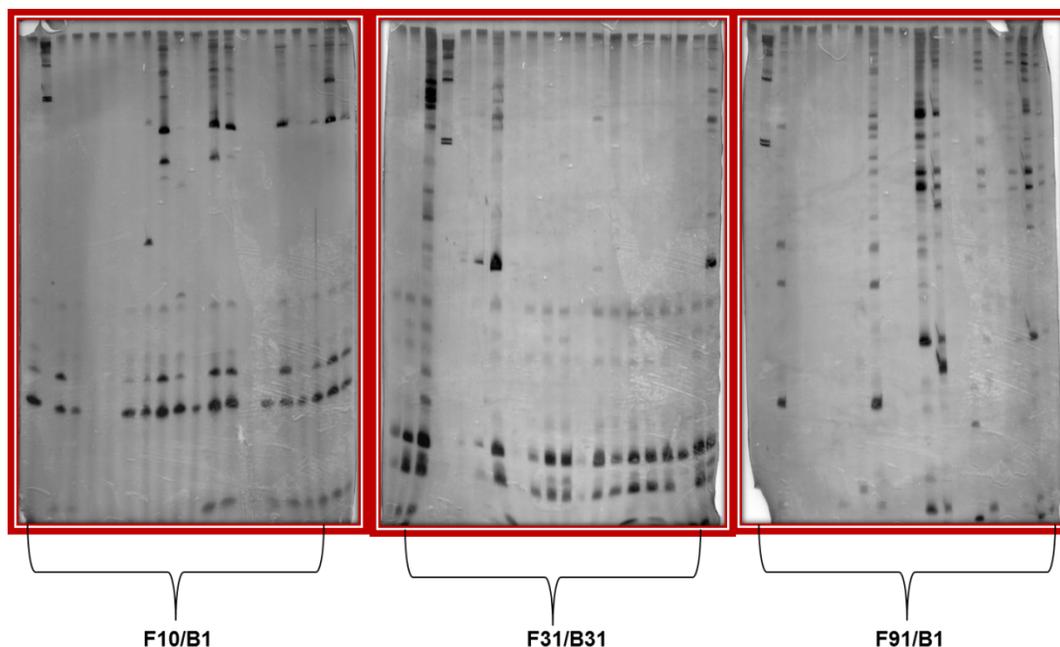


Figura 14.- Patrones de amplificación con tres combinaciones de cebadores de ISTR utilizadas. Muestras *in vitro*.

El patrón de bandas observado en cada combinación de cebadores, es un indicador que nos da información adicional en cuanto a la variabilidad entre las accesiones estudiadas. En el Cuadro 13, se menciona el número de bandas polimórficas producidas por cada cebador, siendo la combinación F91/B1 la que presentó el mayor porcentaje de polimorfismo.

Cuadro 13.- Número de bandas polimórficas y porcentaje de polimorfismo detectado con tres combinaciones de cebadores de ISTR en accesiones de *Dioscorea spp in vitro*.

Iniciadores	Total de bandas producidas	Número de bandas polimórficas	Porcentaje de Polimorfismo
F10/B1	25	19	76
F31/B31	24	9	37.5
F91/B1	30	30	100
TOTAL	79	58	73.41

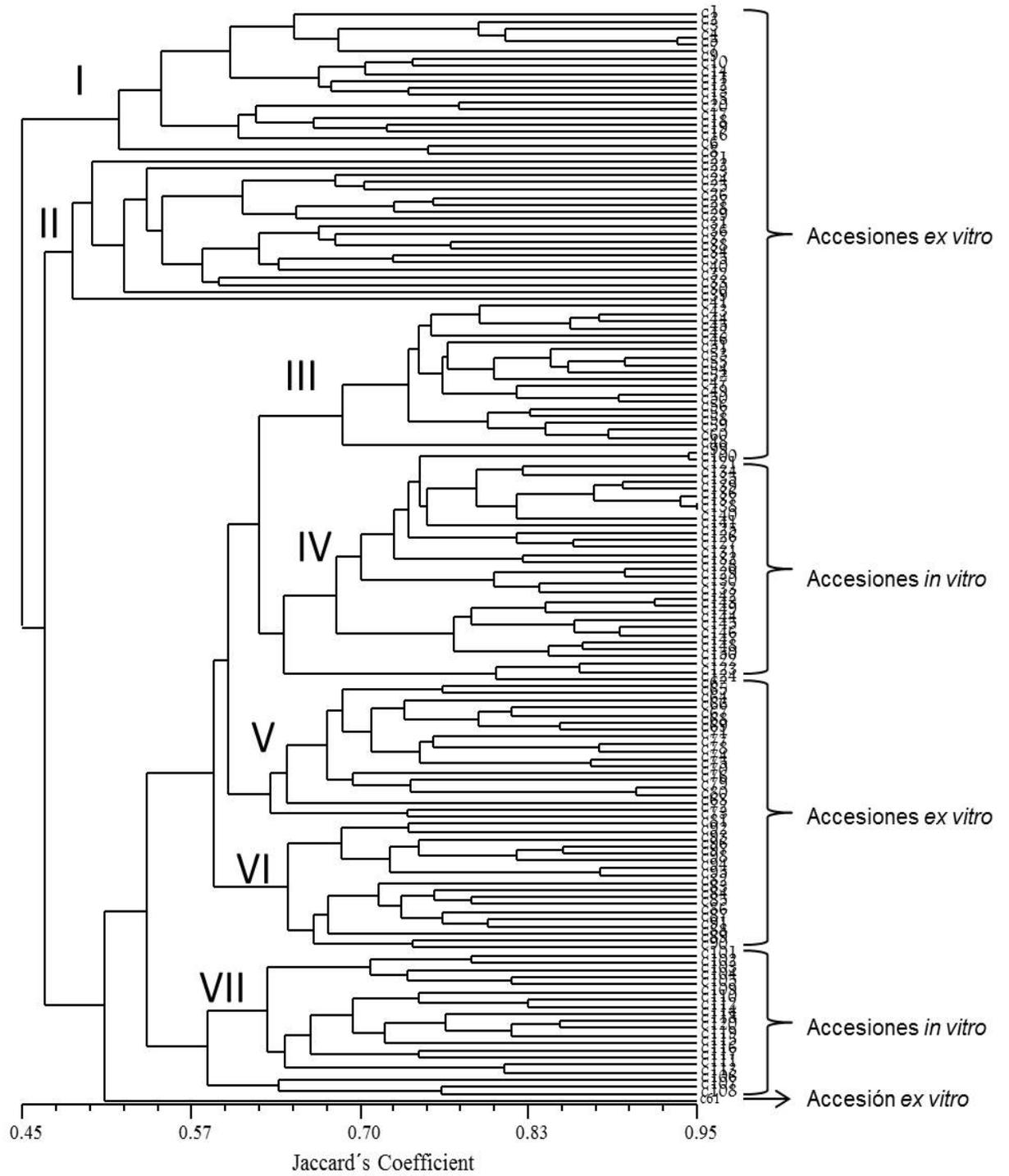


Figura 15.- Dendrograma donde se muestra el agrupamiento de 150 materiales *ex vitro* e *in vitro* de *Dioscorea* spp. provenientes de diferentes localidades del estado de Jalisco, analizados con tres combinaciones de cebadores de ISTR.

6.3.1 Heterocigosidad esperada

Una de las medidas que se utilizaron en el presente trabajo para documentar la variabilidad genética entre las accesiones estudiadas es la heterocigosidad, ya que las diferencias alélicas en un locus de una población indican variación genética (IPGRI, 2003). En el caso de los marcadores utilizados (ISTR), se hizo una inferencia ya que las bandas detectadas representan tanto las formas dominantes como las heterocigotas. Partiendo del criterio de que es casi imposible que dos individuos de una población tengan el mismo genotipo en todos sus loci, la estimación de la heterocigosidad en el caso de *Dioscorea* a partir de estos marcadores, está basada precisamente en el polimorfismo que éstos detectan.

Los resultados indicaron valores de heterocigosidad promedio *ex vitro* de 0.33, mientras que *in vitro* fue de 0.26. Tomando en cuenta que el valor máximo de heterocigosidad es 1, ambas poblaciones se consideran con variabilidad genética baja. Inferir los niveles de heterocigosidad a partir de los marcadores ISTR, ha sido previamente reportado en cactáceas (Montalvo y col., 2010), así como en *A. fourcroydes* utilizando AFLPs (Infante y col., 2007). En ambos trabajos se reportan niveles de heterocigosidad esperada de aproximadamente 0.37.

Con las matrices binarias de presencia/ausencia elaboradas a partir de los perfiles de amplificación ISTR de todos los individuos analizados (100 *ex vitro* y 50 *in vitro*) se realizó un análisis de agrupamiento (Figura 15). El dendrograma producido muestra de igual manera diferencia genética entre y dentro de las poblaciones analizadas. Se observa la formación de siete grupos. Los grupos que incluyen materiales *ex vitro* son I, II, III, V y VI y los que incluyen materiales *in vitro* son IV y VI. Cabe mencionar que estos materiales fueron perfectamente separados por el análisis de agrupamiento, lo que convierte a los ISTRs en una herramienta útil para detectar diferencias genéticas a nivel de genotipo. Se encontraron accesiones de las localidades de Zapotlanejo y San Martín Hidalgo, dispersos en el dendrograma. La distribución de las accesiones se muestra en el Cuadro 14. La

lista completa de las accesiones utilizadas en este estudio se incluye en el Apéndice (A 2).

Cuadro 14.- Distribución de los materiales de acuerdo a los grupos generados en el análisis de agrupamiento.

	Localidad	Accesión
Grupo I	Acatic, Chapala, Ixtlahuacán de los Membrillos, Cocula	<i>Ex vitro</i>
Grupo II	Ixtlahuacán del Río, San Antonio	<i>Ex vitro</i>
Grupo III	San Antonio, San Gabriel, Manzanilla de la Paz	<i>Ex vitro</i>
Grupo IV	Autlán, San Antonio, Manzanilla de la Paz, Ixtlahuacán de los Membrillos, Ixtlahuacán del Río, San Martín Hidalgo	<i>In vitro</i>
Grupo V	San Gabriel, Zapotlanejo y Autlán	<i>Ex vitro</i>
Grupo VI	Autlán, San Martín Hidalgo	<i>Ex vitro</i>
Grupo VII	Acatic, Chapala, Cocula, San Gabriel, Zapotlanejo	<i>In vitro</i>

Torres-Morán y col., (2010) reportó también la capacidad de los ISTR para diferenciar accesiones de campo y micropropagadas, de manera similar a la separación entre accesiones *in vitro* y *ex vitro* del presente trabajo.

Es importante notar que las accesiones provenientes de la localidad de Acatic, que fueron taxonómicamente identificadas como *D. remotiflora* se separaron del resto del grupo *ex vitro* y de igual forma se separaron del resto de materiales *in vitro*.

Dentro de los grupos *ex vitro* el coeficiente de Jaccard tuvo valores que variaron de 0.56 a 0.94 mientras que los grupos conformados por materiales *in vitro* obtuvieron una variación de 0.66 a 0.95. De lo cual puede inferirse que existe mayor similitud genética entre los individuos de las accesiones conservadas *in vitro*. Estos valores son similares a los de Torres-Morán y col., (2010) donde compara materiales *ex vitro* e *in vitro* en agave, asimismo Castillo y col., (2010) en un estudio de papa comparando materiales con ambos métodos de propagación

obtuvieron valores similares a los obtenidos en nuestro estudio, empleado el marcador molecular AFLP lograron detectar cambios a nivel ADN.

6.3.2 Estructura genética

El análisis de estructura genética en los materiales estudiados, confirmó la existencia de diferencias genéticas entre las accesiones *ex vitro* y accesiones *in vitro* (Figura 16). El software STRUCTURE marcó como número óptimo de grupos la simulación $K=6$. Lo anterior difiere con lo encontrado por el análisis de agrupamiento UPGMA en el que se encontraron siete grupos.

En la misma figura, se puede observar que se asignaron tres grupos a los materiales *ex vitro*; grupo referido por el color azul a las localidades pertenecientes a Acatic (1), Chapala (2), Cocula (3) e Ixtlahuacán de los Membrillos (4), el grupo referido por el color rosa Ixtlahuacán del Río (5), Manzanilla de la Paz (6) y San Antonio (7) y el grupo marcado con color rojo pertenecientes a San Gabriel (8), Zapotlanejo (9), Autlán (10) y San Martín Hidalgo (11), los tres grupos conformados con probabilidades altas de pertenencia de cada individuo a su grupo respectivo. La misma situación se observa en los grupos asignados para los materiales *in vitro*, en los que se marcan un grupo color azul tenue para las localidades conformadas por Acatic (1), Chapala (2), Cocula (3), Ixtlahuacán de los Membrillos (4), Ixtlahuacán del Río (5), Manzanilla de la Paz (6) y San Antonio (7), los del grupo verde comprende la localidad de Autlán (10) y el grupo por el color amarillo las localidades de San Gabriel (8) y San Martín Hidalgo (11).

Lo anterior es consistente con la interpretación de por lo menos dos genotipos (en este caso más precisamente tres) distribuidos en todas las regiones muestreadas. En el caso de los materiales pertenecientes a las localidades de Zapotlanejo y San Martín Hidalgo (localidades 9 y 11), se observaron igualmente materiales diferentes de cualquier grupo simulado.

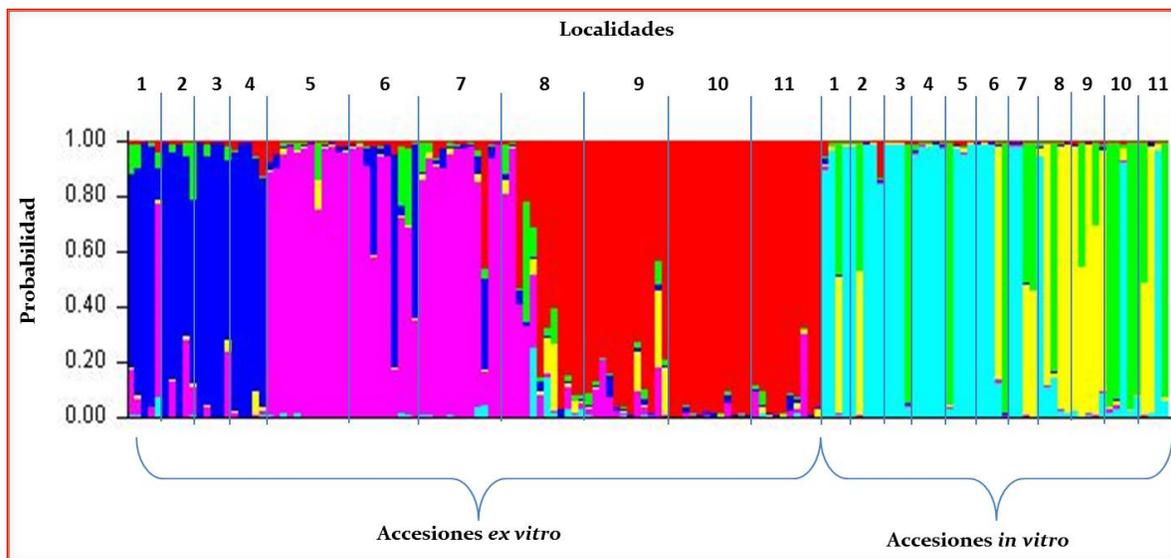


Figura 16.- Representación gráfica del análisis con el programa STRUCTURE donde se muestra la simulación K=6 seis simulaciones.

El coeficiente de diferenciación genética, en términos de frecuencias alélicas (F_{st}), mostró la mayor diferenciación en las localidades dentro del grupo azul tenue (0.7033) que pertenece a materiales *in vitro*, así como las localidades del grupo amarillo (0.5929), sin embargo, a excepción de las localidades del grupo azul, en todos los casos se observó diferenciación muy grande (Cuadro 15).

Cuadro 15.- Valores de diferenciación genética (F_{st}) obtenidos para los valores de K (1-6) sugeridos por el programa STRUCTURE.

Grupo (K)	Valor de F_{st}	Diferenciación Genética
Acatic, Chapala, Cocula, Ixtlahuacán de los Membrillos (Azul)	0.0048	No diversidad
Ixtlahuacán del Rio, Manzanilla de la Paz, San Antonio (Rosa)	0.4729	muy grande
San Gabriel, Zapotlanejo, Autlán y San Martin Hidalgo (Rojo)	0.5898	muy grande
Acatic, Chapala, Cocula, Ixtlahuacán de los Membrillos, Ixtlahuacán del Rio, Manzanilla de la Paz y San Antonio (Azul Tenue)	0.7033	muy grande
Autlán (Verde)	0.3859	muy grande
San Gabriel y San Martin Hidalgo (Amarillo)	0.5929	muy grande

La gráfica de simulación (Figura 16) muestra congruencia con lo obtenido por el análisis UPGMA en donde se observó un agrupamiento similar.

Mercati y col., (2013) reportó que el programa STRUCTURE aplicado a una colección de *Phaseolus vulgaris* L. formó grupo de colores en base a los materiales colectados por localidades donde también muestra congruencia con lo obtenido en el análisis de agrupamiento UPGMA, asimismo López-Zavala y col., (2013) en un estudio hecho con cinco poblaciones de pavos mexicanos empleando el programa STRUCTURE revelaron diversidad genética moderada dentro de las poblaciones y mostraron una correlación con la zona geográfica de procedencia y diferencias morfométricas.

Los niveles de variabilidad genética de una población están definidos por cuatro factores principales: la capacidad de dispersión o migración, los mecanismos de reproducción y de cruzamiento de la especie, la deriva génica y la selección natural (Francisco-Ortega y col., 1996; Silvertown y Charlesworth, 2001). Dentro de ello los mecanismos de producción y cruzamiento son los más determinantes de los niveles de variabilidad genética de poblaciones naturales vegetales (Sosa y col., 2002).

Otro factor que es determinante en la definición del grado de variabilidad de una población natural vegetal es la amplitud de su distribución geográfica, mientras más grande sea esta, mayor la variabilidad (Sosa y col., 2002).

El género *Dioscorea* ha sido reportado con una alta variación genética, usando plantas de diferentes especies y orígenes (Rivera-Jiménez y col., 2012; Sonibare y col., 2010; Hildebrand y col., 2002).

6.4 Análisis de características morfológicas

El análisis de los marcadores morfológicos son la base de los estudios de variabilidad, sin embargo es importante encontrar una correlación con marcadores moleculares, aunque no siempre ésta es satisfactoria, ya que mucha de la variación morfológica, a pesar de estar bajo control genético, depende de estímulos ambientales y cambia con la etapa de madurez de los individuos en cuestión (Sánchez, 2006).

En la actualidad existen descriptores del IPGRI (International Plant Genetic Resources Institute) para el género *Dioscorea*, las características morfológicas que se han tomado en cuenta en estudios previos reportados, coinciden con las tomadas para este estudio en *Dioscorea* spp. (Castillo, 2007).

Con un total de 32 descriptores utilizados para la caracterización de las plantas de camote de cerro (Apéndice A 1), se realizó un análisis de agrupamiento que permitió identificar cuatro grupos con características morfológicas similares (Figura 17).

El primer grupo se encuentra integrado por accesiones de cuatro localidades pertenecientes a San Martín Hidalgo, Zapotlanejo, Manzanilla de la Paz y Chapala. Las características que se encontraron similares en estas accesiones fueron: predominancia de tallos verdes y verdes morados en tallos jóvenes y adultos, presencia de alas en los tallos, número de hojas jóvenes entre 5 y 26, el color verde del peciolo en tallo joven y adulto, en unas colectas unas plantas no presentaron flor y las que lo presentaron fueron de sexo masculino.

El segundo grupo consistió de las colectas de San Gabriel, San Martín Hidalgo, Acatic, Chapala, San Antonio, Ixtlahuacán del Río, Ixtlahuacán de los Membrillos y Manzanilla de la Paz, este grupo está constituido por ocho diferentes localidades con características similares de tallo joven y adulto con colores verdes, verde morado, tallos con alas y sin alas con un número de hojas de 4 a 25 hojas jóvenes, este grupo presentó tanto floración masculina como femenina, con un tipo de inflorescencia en espiga. La localidad de Acatic se distinguió del resto de

localidades por la corola de la flor masculina (diferente estructura) que la distinguió como de la especie *Dioscorea remotiflora*.

El tercer y cuarto grupo asoció las localidades pertenecientes a Manzanilla de la Paz, San Gabriel, Autlán y San Martín Hidalgo con características similares al segundo grupo.

Las características morfológicas se han usado con éxito para clasificar materiales con características similares, tal es el caso de estudios en *Dioscorea* en el CATIE (Aguilar, 2012) y en la Universidad de Chapingo (Martínez, 2001), también en otras especies como *Tigridia pavonia* (Piña-Escutia y col., 2010), Mamey (*Pouteria sapota*) (Gaona-García y col., 2006).

En este trabajo se observó variación morfológica para esta especie en el estado de Jalisco, coincidiendo con Martínez (2001) quien caracterizó 32 colectas en La Chontalpa, Tabasco utilizando 19 descriptores morfológicos. Castillo (2007), realizó colectas de *Dioscorea* de 15 localidades de Jalisco obteniendo resultados similares a los encontrados en este proyecto.

En el presente trabajo, la distribución de las accesiones dentro de los cuatro grupos, es acorde a las localidades.

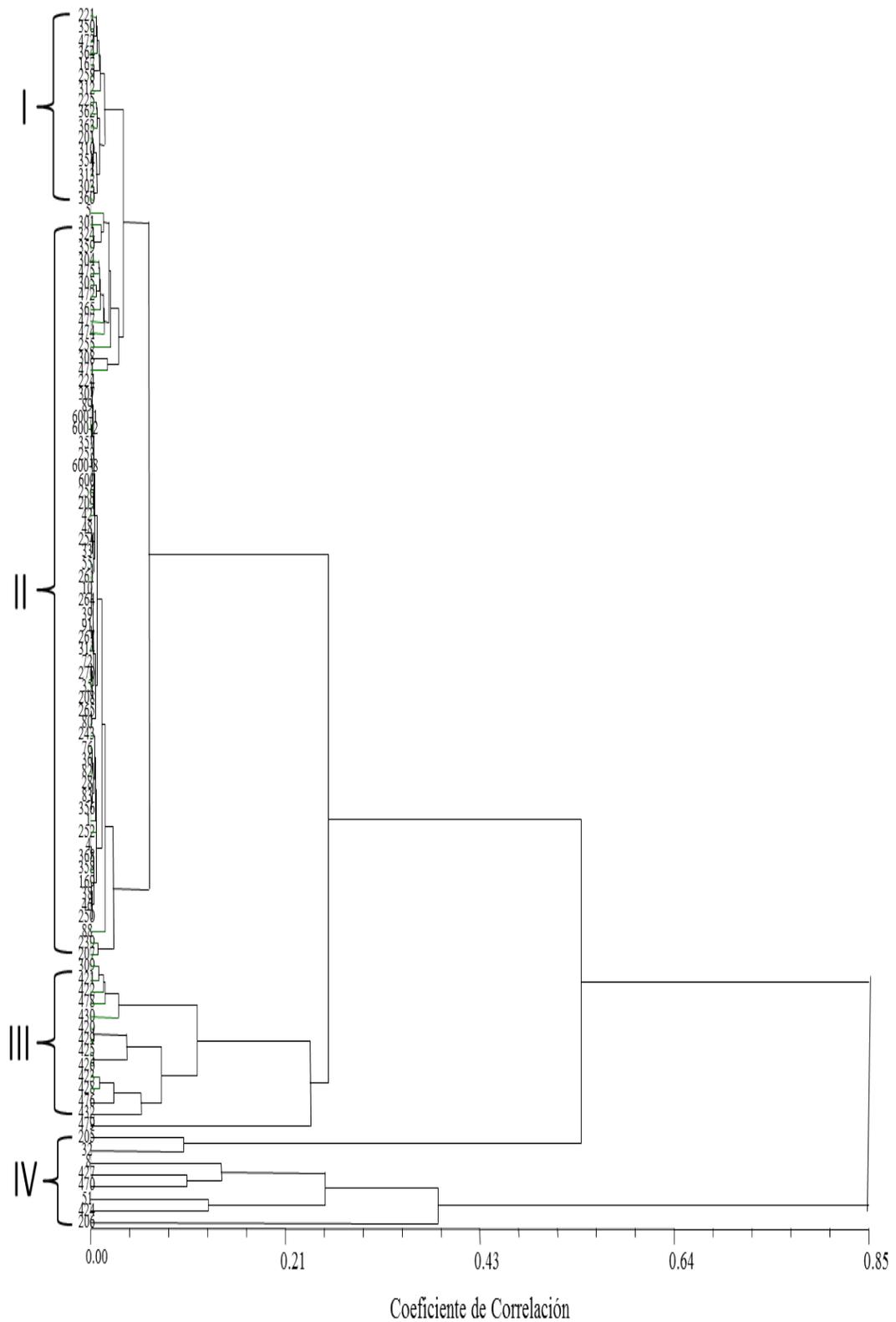


Figura 17.- Clasificación de las 100 accesiones de camote de cerro con base a las 32 características morfológicas de la planta.

Las 32 variables morfológicas fueron estandarizadas para obtener media cero y varianza 1. Posteriormente, se obtuvo la matriz de correlación como medida de similitud entre los individuos. El análisis de componentes principales (CP), se presenta en la gráfica biplot de la Figura 18.

Los primero dos componentes, explicaron el 89.39% de la variación total observada (Cuadro 16).

Cuadro 16.- Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componentes principales en accesiones de *Dioscorea* spp.

Componentes Principales (CP)	Valores Propios	Absoluta (%)	Acumulada (%)
CP1	19.400	60.625	60.62
CP2	9.207	28.773	89.39
CP3	1.080	3.375	92.77
CP4	0.908	2.839	95.61
CP5	0.692	2.162	97.77
CP6	0.201	0.629	98.40
CP7	0.167	0.523	98.92
CP8	0.104	0.327	99.63
CP9	0.073	0.229	99.75
CP10	0.047	0.148	99.25
CP11	0.037	0.118	99.90
CP12	0.032	0.101	99.48
CP13	0.017	0.054	99.96
CP14	0.010	0.032	99.63
CP15	0.008	0.027	99.75
CP16	0.003	0.011	99.85
CP17	0.002	0.007	99.90
CP18	0.001	0.004	99.94
CP19	0.001	0.003	99.96
CP20	0.000	0.002	99.97
CP21	0.000	0.001	99.98
CP22	0.000	0.000	99.99
CP23	0.000	0.000	99.99
CP24	0.000	0.000	99.99
CP25	0.000	0.000	100
CP26	0.000	0.000	100
CP27	0.000	0.000	100
CP28	0.000	0.000	100
CP29	0.000	0.000	100
CP30	0.000	0.000	100
CP31	0.000	0.000	100
CP32	0.000	0.000	100

En la Figura 18, se puede observar la gráfica biplot que muestra la distribución de las accesiones de acuerdo a las variables agrupadas por los componentes.

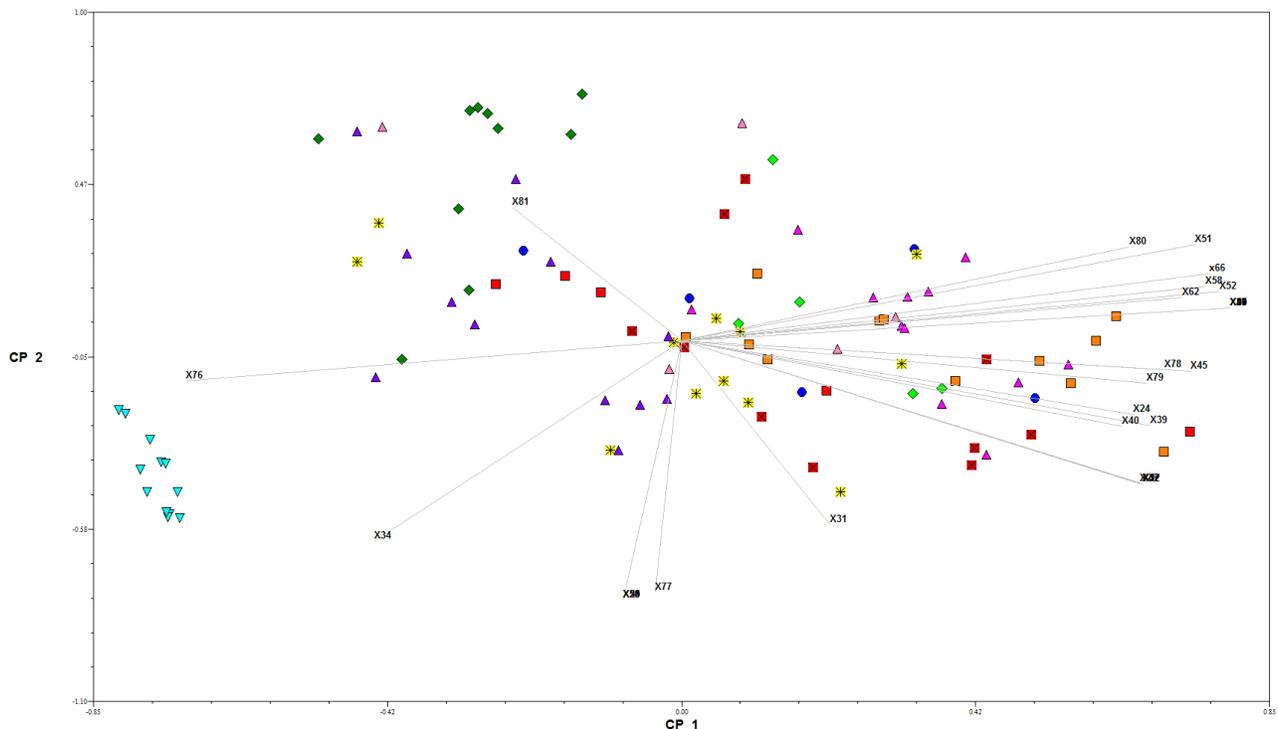


Figura 18.- Gráfica biplot donde se representan las variables y genotipos de camote de cerro, en función de los dos primeros componentes principales. Acatic (●), Chapala (■), Cocula (◆), Ixtlahuacán de los Membrillos (▲), Ixtlahuacán del Río (△), Manzanilla de la Paz (⊠), San Antonio (■), San Gabriel (⊠), Zapotlanejo (▲), Autlán (▼), San Martín Hidalgo (◆).

En el componente principal 1 (CP1) explicó el 60.62% de variación total y fue definido principalmente por: Posición de la hoja, color de la hoja, color de la nervadura, color del borde de la hoja, Forma del ápice de la hoja, Posición más ancha de la hoja, pilosidad del peciolo, floración, Posición de la inflorescencia, Tipo de inflorescencia, Formación del fruto, Desarrollo del fruto, Posición del fruto, Ausencia/Presencia de semillas en el fruto, Forma de la semilla, Estructura de la semilla, Altura del tallo, Días hasta la floración, Longitud media de la inflorescencia, Sexo de la planta, Peso del tubérculo. (Cuadro 17).

Cuadro 17.- Vectores propios de los primeros cuatro componentes principales de las variables morfológicas.

Clave de las variables	Variables	CP1	CP2	CP3	CP4
X20	Posición de las hojas maduras	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X24	Color de las hojas maduras	0.8153	-0.2824	0.4109	0.1180
X25	Color de la nervadura de la hoja	0.8277	-0.5444	-0.0345	0.0547
X27	Color del borde de la hoja	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X28	Pilosidad en el haz de la hoja madura	-0.1049	-0.9878	-0.0701	0.0637
X29	Pilosidad en el envés de la hoja	-0.1049	-0.9878	-0.0701	0.0637
X31	Forma de la hoja	0.2679	-0.7025	-0.0362	-0.2189
X32	Forma del ápice de la hoja madura	0.8328	-0.5445	-0.0386	0.0541
X34	Distancia entre lóbulos de la hoja	-0.5554	-0.7646	-0.1098	0.0137
X39	Posición más ancha de la hoja madura	0.8474	-0.3241	0.3527	0.0265
X40	Color de la punta de la hoja	0.7962	-0.3280	0.4151	0.0342
X41	Pilosidad del peciolo de la hoja	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X45	Floración	0.9191	-0.1160	0.2144	0.1980
X47	Posición de la inflorescencia	0.8319	-0.5446	-0.0382	0.0521
X49	Tipo de inflorescencia	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X50	Color de la flor	-0.1049	-0.9878	-0.0701	0.0637
X51	Formación del fruto	0.9276	0.3651	0.0034	0.0421
X52	Desarrollo del fruto	0.9717	0.1861	0.0636	-0.0437
X53	Posición del fruto	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X54	Forma del fruto	-0.1049	-0.9878	-0.0701	0.0637
X55	Pilosidad del fruto	-0.1049	-0.9878	-0.0701	0.0637
X56	Ausencia/Presencia de semillas en el fruto	0.9910	0.1246	0.0088	0.0135
X57	Forma de la semilla	0.8333	-0.5444	-0.0387	0.0547
X58	Estructura del ala de la semilla	0.9464	0.2051	-0.0635	0.1593
X62	Altura de tallos maduro	0.9046	0.1624	-0.2841	-0.0549
X66	Diámetro del tallo maduro	0.9527	0.2549	0.0078	-0.0778
X76	Días hasta la floración después del brote	-0.8954	-0.1551	0.2846	-0.2411
X77	Número de inflorescencia p/planta	-0.0472	-0.9585	-0.1118	0.1286
X78	Longitud media de la inflorescencia	0.8723	-0.1110	-0.3242	-0.2437
X79	Sexo de la planta	0.8406	-0.1627	-0.2470	-0.3366
X80	Peso del tubérculo	0.8091	0.3567	-0.3337	-0.0152
X81	Largo del Tubérculo	-0.3055	0.5057	-0.2547	0.6977

En el análisis bliplot (Figura 18) fue evidente la separación de las accesiones provenientes de Autlán (▼) y San Martín Hidalgo (◆) lo que correspondería probablemente a genotipos diferentes a las demás. Las accesiones de Manzanilla de la Paz (⊠) y San Antonio (■) se encontraron en el cuadrante uno. El resto de las accesiones se distribuyeron a lo largo de la gráfica.

Las variables agrupadas en el componente principal 2 (CP2): Pilosidad en el haz de la hoja, Pilosidad en el envés de la hoja, Color de la flor, Forma del Fruto, Pilosidad del Fruto y Número de Inflorescencia p/planta, separaron las accesiones de San Martín Hidalgo (◆).

6.5 Identificación taxonómica

De las 100 plantas analizadas, 95 fueron clasificadas como *Dioscorea sparsiflora* Helms y las restantes pertenecientes a Acatic fueron identificadas como *Dioscorea remotiflora* Kunth. (Figura 19).

De acuerdo con las claves taxonómicas de material pistilado y estaminado de Mc Vaugh (1989) se identificaron las especies con las de ***D. remotiflora* Kunth** y ***D. sparsiflora* Helms**.



Figura 19.- Material herborizado de las especies *D. remotiflora* y *D. sparsiflora*.

VII CONCLUSIONES

Con respecto a los protocolos de extracción de ADN el método reportado por Keb-Llanes y col., 2002 fue el que produjo ADN de calidad más adecuada para las técnicas de marcadores moleculares usados en el presente trabajo.

Los marcadores dominantes RAPD y AFLP fueron los más eficientes para la detección de diferencias genéticas entre las accesiones de *Dioscorea*.

La caracterización molecular realizada en el presente trabajo generó información acerca de las accesiones (genotipos) en las localidades muestreadas de Jalisco. Los genotipos similares fueron agrupados en concordancia con su localidad.

Los marcadores ISTR fueron capaces de detectar variación intra e interoblacional en el género *Dioscorea*. La detección de esa variabilidad molecular puede brindar elementos para la delimitación específica de acuerdo a un perfil tipo de amplificación ISTR para cada especie.

El marcador ISTR logró detectar cambios a nivel ADN, se observó variación tanto *in vitro* como *ex vitro*. La comparación entre los métodos de propagación indicó que si existe cambio genético entre las plantas.

Los resultados del análisis morfológico permitieron identificar cuatro grupos con características morfológicas similares principalmente en hoja, tallo y fruto.

Se identificaron dos especies en las 11 localidades del estado de Jalisco; la más predominante fue *Dioscorea sparsiflora* seguida de *Dioscorea remotiflora*.

El conocimiento de un recurso natural facilita su aprovechamiento sostenible. Los resultados de este trabajo proporcionan datos que ayudan a conocer al género *Dioscorea* principalmente a las especies *Dioscorea sparsiflora* y *Dioscorea remotiflora*, para contribuir en apreciar y conservar este importante recurso fitogenético, en el estado de Jalisco.

VIII LITERATURA CITADA

- Aagaard, J.E.**, Konstantin, V.K. y Steven, H.S. 1997. RAPDs and allozymes exhibit similar levels of diversity and differentiation among populations and races of Douglas-fir. The Genetical Society of Great Britain. Oregon State University, Corvallis, vol. 2 .p. 250-265
- Aguilar, Z.I.** 2012. Caracterización morfológica y molecular de la colección de *Dioscorea* spp. del Banco de Germoplasma del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), Costa Rica. Tesis de Maestría. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). p. 92.
- Ammirato, P. V.** 1976. Hormonal control of tuber formation in cultured axillary buds of *Dioscorea bulbifera* and *Dioscorea alata*. Plant Physiology. vol. 57. p. 66.
- Arnau, G.**, Nemorin, A., Maledon, E y Abraham, K. 2009. Revision of ploidy status of *Dioscorea alata* L. (Dioscoreaceae) by cytogenetic and microsatellite segregation analysis. Theoretical and Applied Genetics. vol.118. p. 1239 - 1249.
- Bernabé-Antonio, A.**, Santacruz-Ruvalcaba, F y Cruz-Sosa, F. 2012. Effect of plant growth regulators on plant regeneration of *Dioscorea remotiflora* (Kunth) through nodal explant. Plant Growth Regulator. vol. 68. p. 293-301.
- Bellon, M.R.** 2009. Diversidad y conservación de recursos genéticos en plantas cultivadas, en Capital natural de México, vol. 2. Estado de conservación y tendencias de cambio. CONABIO, México, p. 355-382.
- Bradley, S.A** y McLaughlin, R.L. 2007. High-resolution magic-angle spinning NMR for the identification of reaction products directly from thin-layer chromatography spots: Journal of Magnetic Resonance. vol. 45. p. 814-818.
- Bornet, B.** y Branchard, M. 2001. Nonanchored inter simple sequence repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. Plant Molecular Biology Reporter. vol. 19. p. 209-215.

- Caddick, L.R.**, Wilkini, P., Rudall, P.J., Terry A. J., Hedderson y Mark W.C. 2002. Yams reclassified: a recircumscription of Dioscoreaceae and Dioscoreales. *Taxon*. vol. 51. p. 103-114.
- Calla, A.F.M.C.**, Pérez, D.V.J y Serrera, G.C. 1999. La Agricultura en el umbral del siglo XXI. Foro Agrario. Ediciones Mundi-Prensa, España. p. 251.
- Castañeda-Nava, J.J.** 2012. Análisis citogenético y estomático para determinar los niveles de ploidía en camote de cerro (*Dioscorea* spp.). Tesis de Maestría en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. CUCBA. Universidad de Guadalajara. p. 86.
- Castellanos, E.G.E.** 2011. Relaciones genéticas entre formas silvestres, cultivadas e intermedias del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) del occidente de México basadas en ISTRs. Tesis de Licenciatura en Biología. CUCBA. Universidad de Guadalajara. p. 86.
- Castillo, C.** 2007. Colecta y caracterización morfológica de camote de cerro (*Dioscorea* spp) en el estado de Jalisco. Tesis de Maestría en Ciencias Agrícolas y Forestales. CUCBA. Universidad de Guadalajara. p. 84.
- Castillo, C.J.G.**, Vargas, D., Estévez, A., Hernández, M.M., Salomón, J.L., Aymara Pérez, Borrás-Hidalgo, O., López y Arencibia, A.D. 2010. Determinación de la estabilidad genética en cuatro especies del banco de germoplasma de papa en Cuba conservadas *in vitro*. *Cultivos tropicales*. vol. 31. p. 116-225.
- CONABIO.** 2000. Estrategia nacional sobre biodiversidad de México. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad, México. p. 103.
- Cervantes, S.T.** 1976. Efectos genéticos y de interacción genotipo ambiente en la clasificación de razas mexicanas de maíz. Tesis de Doctor en Ciencias. Colegio de Postgraduados. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo, Mex. p. 139.

- Cota-Sánchez, J. H.**, Remarchuk, K. y Ubayasena, K. 2006. Ready to use DNA extracted with a CTAB Method adapted for Herbarium Specimens and Mucilaginous Plant Tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*. vol. 24. p. 161-165.
- Cuevas, S.**, Miranda, J.A y Sahagún C.J. 1997. Fitodomesticación: Conceptos y métodos para su estudio. Ed: Programa Nacional de Etnobotánica, Universidad Autónoma de Chapingo. p. 25.
- Dansi, A.**, Mignouna, H.D., Zoun Djihekpon, J., Sangare, A., Asideu, R y Ahoussou, N., 2000. Using isozyme polymorphism to assess genetic variation within cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/ Dioscorea rotundata* complex) of the Republic of Benin. *Genetic Resources and Crop Evolution*. vol. 47. p. 371-383.
- Enríquez, G.** 1966. Selección y estudio de los caracteres de la flor, la hoja y la mazorca, útiles para la identificación y descripción de cultivares de cacao. IICA (Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, CR) OEA, CATIE, Turrialba CR. p. 64-71.
- Enríquez, G.** 1991. Descripción y evaluación de los recursos genéticos. En *Técnicas para el manejo y uso de los recursos genéticos vegetales*. Castillo, R. Estrella, J y Tapia, C. eds. Editorial Porvenir. Quito EC. p. 116 – 160.
- Falconer, D.S.** 1981. *Introduction to Quantitative Genetics*. 2nd Ed. Longman, London. p. 530.
- Feschotte, C.**, Jiang, N. y Wessler, S.R. 2002. Plant transposable elements. Where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics*. vol. 3. p. 329-341.
- Francisco-Ortega, J.**, Crawford, D., Santos-Guerra, A. y Carvalho, J. 1996. Isozyme differentiation in the endemic genus *Argyranthemum* (Asteraceae: Anthemideae) in the Macaronesian Islands. *Plant Systematics and Evolution*. vol. 200. p. 137-152.
- Fuentes, Y.J.L.** 1998. *Botánica Agrícola*. Ediciones Mundi-Prensa, Madrid. p. 315.

- Gaona-García, A.**, Alia-Tejacal, I., López-Martínez, V., Andrade-Rodríguez, M., Colinas-León, M.T y Villegas-Torres, O. 2006. Caracterización de frutos de zapote mamey (*Pouteria sapota*) en el suroeste del estado de Morelos. Revista Chapingo Serie Horticultura. vol. 14. p. 41-47.
- García-Ruiz, I.** 2009. Estudios Básicos para el aprovechamiento del “camote de cerro” (*Dioscorea* spp.) en la región Ciénega de Chapala, México. Informe Técnico del Instituto Politécnico Nacional.
- González, M.C.** 2006. Caracterización morfológica y molecular de genotipos de *Dioscorea alata* y *Dioscorea trifida* del Instituto de Investigación Agropecuaria de Panamá, IDAP y CATIE, Costa Rica. p. 20.
- Guizar, M.A.**, Montañez, S.J.L., García, R.I y Venegas G.J. 2008. Composición química y valor nutricional del camote del cerro (*Dioscorea* spp). VI Jornadas Científicas de Biomedicina y Biotecnología Molecular. p. 300.
- Hamon, P.** y Toure, B. 1990. Characterization of traditional yam varieties belongin to the *Dioscorea cayenensis-rotundata* complex by their isozymic patterns. Euphytica. vol. 46. p. 101-107.
- Hanson, J.** 1986. Methods of storing tropical root crop germ plasm with special reference to yam. Plant Genetic Resources. Newsletter (IBPGR/FAO). vol. 64. p. 24-32.
- Havecker, E.R.**, Gao, X. y Voytas, D.F. 2004. The diversity of LTR retrotransposons. Genome Biology. vol. 5. p. 225-241.
- Hawtin, G.**, Iwanaga, M. y Hodgkin, T. 1996. Genetic resources in breeding for adaptation. Euphytica. vol. 92. p. 255-266.
- Hildebrand, E.**, Demissew, S. y Wilkin, P. 2002. Local and regional disappearance in species of *Dioscorea* L. (Yams) in southwest Ethiopia. En: Stepp, J. R.; Wyndham, F. S. y Zarger, R. R. (eds.). Ethnobiology and Biocultural Diversity. Proceedings of the 7th International Congress of Ethnobiology. University of Georgia Press. p. 678 – 695.

- Huber, H.** 1998. Dioscoreaceae. The Families and Genera of Vascular Plants, Springer, Berlin. vol. 3: Monocotyledons, Lillanae (except Orchidaceae). p. 216-23.
- Infante, D.**, Molina, S., Osorio, M y González, G. 2007. Genetic improvement of asexually propagated plants. In: Lizts RE, Scorza R (eds) Proceedings of the International System on temperate fruits crops and tropical species. ISHS, Daytona Beach, USA, p. 721-728.
- IPGRI.** 2003. Genetic diversity analysis with molecular marker data: Learning Module. IPGRI and Cornell University. p. 71.
- Jaramillo, S** y Baena, M., 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Cali, Colombia. p. 73.
- Jhang, T.**, Kaur, M., Kalia, P. y Sharma, T.R. 2010. Efficiency of different marker systems for molecular characterization of subtropical carrot germplasm. Journal of Agricultural Science. vol. 148. p. 171-181.
- Kalendar, R.**, Vicient, O., Peleg, K., Anamthawat-Jonsson, A., Bolshoy, P y Schulman, A. H. 2004. Large retrotransposon derivatives: abundant, conserved but non autonomous retroelements of barley and related genomes. Genetics. vol. 166. p. 1437-1450.
- Karp, A.**, Seberg, O y Buatti, M. 1996. Molecular techniques in the Assessment of Botanical Diversity. Annals of Botany. vol. 78. p.143-149.
- Kay, D. E.** 1987. Cultivos de Raíz. Londres: Instituto de Investigaciones para el Desarrollo y Tropical. p. 240.
- Kazazian, H.H.** 2004 Mobile elements drivers of genome evolution. Science Evolution. vol. 303. p.1626-1632.
- Keb-Llanes, M.**, González, G., Chi-Manzanero, B e Infante, D. 2002. A rapid and simple method for small scale DNA extraction in Agavaceae and other tropical plants. Plant Molecular Biology Reporter. vol. 20. p. 6-18.
- Lebas, B.S.M.** 2002. Diversity of virases infesting Dioscorea species in the south pacific. A thesis submitted in partial fulfilment of the requirements of the

University of Greenwich for the Degree of Doctor of Philosophy (Ph.D.). The University of Greenwich Natural Resources Institute. p.113.

- Lightbourn, G.** y Veilleux, R. 2003. Retrotransposon based markers to characterize somatic hybrids and assess variation induced by protoplast fusion of monoploid potato. *Acta Horticulturae ISHS*. vol. 619. p. 235-242.
- López-Zavala, R.**, Cano-Camacho, H., Chassin-Noria, O., Oyama, K., Vazquez-Marrufo, G. y Zavala-Páramo, G. 2013. Genetic diversity and population structure of Mexican domesticated turkeys. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. vol. 4. p. 417-434.
- Malaurie, B.**, Pungu, O. y Trouslot, M. 1995. Effect of growth regulators concentrations on morphological development of meristem tips in *Dioscorea cayenensis* *D. rotundata* complex and *D. praehehensili*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. vol. 41. p. 229-235.
- Mandal, R. C.** 1993. *Tropical Root and Tuber Crops*. India, Agrobotanical Publishers. p. 396.
- Manly B.F.J.** 1997. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo Methods in Biology*. Chapman and Hall, London. p. 399.
- Mantell, S.H.** y Haque, S.Q. 1977. Three techniques for rapid clonal propagation of White Lisbon yam (*Dioscorea alata* L.). *Nouveau Agronomy. Antille-Guyane*. p. 413-427.
- Mao-Feng, Y.**, Ren-Chao, Z., Ye-Lin, H., Guo-Rong, X., Su-Hua, S. y Li, F. 2010. Genetic Diversity and Geographical Differentiation of *Desmodium triflorum* (L.) DC. in South China Revealed by AFLP Markers. *Journal of Plant Biology*. vol. 53. p. 165–171.
- Mc Clintock, B.** 1950. The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceeding of the National Academy of Science*. vol. 36. p. 344-355.
- Mc Vaugh, R.** 1989. Bromeliaceae to Dioscoreaceae. *Flora Novo-Galiciana, a descriptive account of the vascular plants of Western México*. The University of Michigan Herbarium. vol. 15. p. 355-388.

- Martínez, M.E.** 2001. Colecta y caracterización de tubérculos de ñame *Dioscorea* spp en la chontalpa, Tabasco. Tesis de Maestría. Colegio de Potsgraduados, Montecillo Texcoco, Edo. de México. p. 94.
- Mercati, F.**, Leone, M., Lupini, A., Sorgona, A., Bacchi, M., Abenavoli, M.R y Sunseri, F. 2013. Genetic diversity and population structure of a common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) collection from Calabria (Italy). Genetic Resource and Crops Evolution, vol. 60. p. 839-852.
- Mignouna, H.D.**, Dansi, A y Zok, S. 2002. Morphological and isozymic diversity of the cultivated yams (*Dioscorea cayenensis/Dioscorea rotundata* complex) of Cameroon. Genetic Resources and Crop Evolution. vol. 4. p. 29.
- Mignouna, H.D** y Dansi, A. 2003. Yam (*Dioscorea* spp) domesticated by the Nago and fon ethnic groups in Benin. Genetic Resource and Crops Evolution. vol. 50. p. 519-528.
- Montaldo, A.** 1991. Cultivo de Raíces y tubérculos. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. p. 1
- Montalvo, F.G.**, Ortiz, G.M., Quiala, M.M., Keb-Llanes, M., Rojas, L.M., Bautista, A., Maruchi, A.E., Quiroz M., Wolfgang, R. y Lorenzo, F.S.T. 2010. Primer reporte del empleo de marcadores ISTR en Cactaceae (*Pilosocereus* sp). Revista Colombiana de Biotecnología, vol. 12. núm. 2. Universidad Nacional de Colombia. p. 223-229.
- Mostul, B.L** y Cházaro, M. 1996. Camote de cerro, *Dioscorea* from México. Cactus and Succulent Journal. vol. 68. p. 6-8.
- Muñoz de Malajovich, M. A.** 2006. Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmes. p. 87.
- Murashige, T.** y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiology Plantarum. p. 473-497.

- Ng, S.Y** y Hahn., K. 1985. Aplicación de cultivo de tejidos de tubérculos en el IITA. En la biotecnología en la Investigación Agrícola Internacional: IRRI, Manila, Filipinas. p. 29 – 40.
- Ondo, P.**, Kevers, C. y Dommès, J. 2007. Axillary proliferation and tuberization of *Dioscorea cayenensis D. rotundata* complex . Plant Cell Tissue and Organ Culture. vol. 91. p. 107-109.
- Osorio, Z.**, Infante, D y Molina, S. 2006. Variación genética asexual en *Agave cocui* Trelease. Boletín Nakari, 17:1-7. Edición digital.
- Pierik, R.L.M.** 1987. *In vitro* culture of higher plants. Editorial Martinus Nijhoff Publishers. p. 300.
- Piña-Escutia, J.L.**, Vences-Contreras, C., Gutiérrez-Martínez, M.G., Vázquez-García, L.M y Arzate-Fernández, A.M. 2010. Caracterización morfológica de nueve variedades botánicas de *Tigridia pavonía* (L.f). DC. Agrociencias. Colegio de Postgraduados. vol. 44. p. 147-158.
- Pradeep, R.**, Sarla N. y Siddiq E.A. 2002. Inter Simple Sequence Repeats (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. Euphytica. vol. 5. p. 14.
- Pritchard, J.K.**, Stehens, M y Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics. vol. 155. p.945-959.
- Reif, J.C.**, Melchinger, A.E y Firsch, M. 2004. Genetical and Mathematical Properties of Similarity and Dissimilarity Coefficients Applied in Plant Breeding and Seed Bank Management. Crop Science. vol. 45. p. 17-7.
- Rhode, W.** 1996. Inverse sequence-tagged repeat (ISTR) analysis, a novel and universal PCR-based technique for genome analysis in plant and animal kingdom. Journal of Genetics and Breeding. vol. 50. p. 249-261.
- Rohlf, F. J.** 2009. NTSYSpc: Numeral Taxonomy System. Ver. 2.21. Exeter Software. Stauket, New York.

- Rivera-Jiménez, H.,** Álvarez, A., Palacio-Mejía, A. y Alba, O. 2012. Caracterización molecular de accesiones de ñame (*Dioscorea alata* L.) de la región Caribe Colombiana. Revista U.D.C.A Actualidad y Divulgación Científica. vol.15. p. 323 – 330.
- Rodríguez, W.** 2000. Botánica, domesticación y fisiología del cultivo de ñame (*Dioscorea alata*). Agronomía Mesoamericana. vol. 11. p. 133-152.
- Roldan-Ruiz I.,** Dendauw J., Van, B.E., Depicker A. y De Loose, M. 2000. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). Molecular Breeding. vol. 6. p. 125–134.
- Sambrook, J.** y Russell, D. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd edn. Cold Spring Harbor Press, New York. p. 2344.
- Sánchez, G.J.J.** 2006. Apuntes de la clase: Genética de Conservación de Recursos Fitogenéticos. CUCBA. Universidad de Guadalajara. p. 280.
- SanMiguel, P.** y Bennetzen, J.L. 1998. Evidence that a Recent Increase in Maize Genome Size was Caused by the Massive Amplification of Intergene Retrotransposons. Annals of Botany. vol. 82. p. 37-44.
- Sarwat, M.,** Das, S y Srivastava, P.S. 2008. Analysis of genetic diversity AFLP, SAMPL, ISSR and RAPD markers in *Tribulus terrestris*, a medicinal herb. Plant Cell Reports. vol. 27. p. 519-528.
- Silvertown, J.W** y Charlesworth, D. 2001. Introduction to plant population biology. 4th. ed. Blackwell. Oxford. p. 605-609.
- Solís, R.L** y Andrade, T.A. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? La ciencia y el hombre. Revista de divulgación científica y tecnológica de la Universidad Veracruzana. Consultada: 20 de Agosto de 2013. <http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>.
- Sonibare, M.,** Asiedu, R. y Albac, D. 2010. Genetic diversity of *Dioscorea dumetorum* (Kunth) Pax using Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) and cpDNA. Biochemical Systematics and Ecology. vol. 38. p. 320-334.

- Sosa, P.**, González-Pérez, M.A y Bouza, N. 2002. La conservación genética de las especies vegetales amenazadas. En: biología de la conservación de plantas amenazadas. Técnica de diagnóstico del estado de conservación. Organismo Autónomo de Parques Nacionales. Ministerio de Medio Ambiente de España. p. 200.
- Szabó, A.T.** 2005. Book Reviews-Resolving the challenge posed by agrobiodiversity and plant genetic resources an attempt. Journal of Agriculture and Rural Development in the Tropics and Subtropics, Beiheft 76. Kassel University Press GmbH and 2004. (www.upress.uni-kassel.de). p. 184.
- Tamirú, M.**, Becker, H y Maass, B. 2007. Genetic diversity in yam germplasm from Ethiopia and their relatedness to the main cultivated *Dioscorea* species assessed by AFLP markers. Crop Science. vol. 47. p. 1744- 1753.
- Torres-Morán, M.I.**, Escoto-Delgadillo, M., Molina-Moret, S., Rivera-Rodríguez, D.M., Velasco-Ramírez, A.P., Infante, D. y Portillo, L. 2010. Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus *in vitro* culture. Plant Cell Tissue and Organ Culture. vol. 103. p. 403-409.
- Valadez, M.E.** y Khal, G. 2000. Huellas del ADN en genomas de plantas (teorías y protocolos de laboratorio) Ed. Mundi-Prensa, S.A., México. p.147.
- Valls, J. F.M.** 1989. Caracterización morfológica, reproductiva y bioquímica de germoplasma vegetal. Curso de Tecnología de Sementes para Bancos de Germoplasma, CENARGEN, Brasilia, Brasil. p. 23.
- Vos, P.**, Hogers, R. Vos, P., Hogers, R. y Bleeker, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Research. vol. 23. p. 4407–4414.
- Wilson, L.A.** 1977. Root Crops. In Alvin, P.T., Kozlowski, T.T. eds. Ecophysiology of tissue. vol. 3. p. 11-22.

- Wolfe, A.** 2000. ISSR Resource Website. <http://www.biosci.ohio-state.edu/~awolfe/ISSR/ISSR.html>. Consultada: 20 de Agosto de 2013.
- Youssef, M.**, Rivera-Madrid, J., Rodomiro-Ortiz, M y Escobedo-Gracia, M. 2011. Musa Genetic Diversity Revealed by SRAP and AFLP. *Molecular Biotechnology*. vol. 4. p.189–199.
- Zhao, F.**, Wang, X., Liu, J y Duan, D. 2007a. Population genetic structure of *Sargassum thunbergii* (Fucales, Phaeophyta) detected by RAPD and ISSR markers. *Journal of Applied Phycology*. vol. 19. p. 409–416.
- Zhao, G.**, Zhang, Z., Sun, H y Dai, H. 2007b. Isolation of *Ty1-copia-like* retrotransposons sequence from the apple genome by chromosome walking based on modified SiteFinding-Polymerase chain reaction. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*. vol. 39. p. 675-683.
- Zietkiewicz E.**, Rafalski A. y Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeats (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*. vol. 20. p. 176-183.

APÉNDICE

A 1 Variables utilizadas en la descripción morfológica.

X20 Posición de las hojas escamadas en el tallo maduro

- 1 Alternadas
- 2 Opuestas
- 3 Ambas
- 4 Verticiladas

X24 Color de las hojas jóvenes

- 1 Amarillento
- 2 Verde claro
- 3 Verde oscuro
- 3 Verde morado
- 4 Morado
- 99 Otro

X25 Color de la nervadura de la hoja

- 1 Amarillento
- 2 Verde
- 3 Morado claro
- 4 Morado
- 99 Otro

X27 Color del borde de la hoja

- 1 Verde
- 2 Morada
- 99 Otro

X28 Pilosidad en el haz de la hoja madura

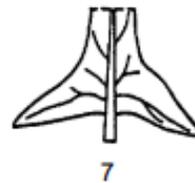
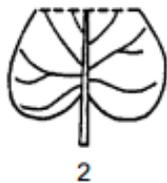
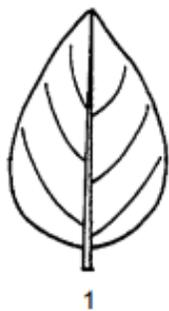
- 3 Escasa
- 7 Densa

X29 Pilosidad en el envés de la hoja madura

- 3 Escasa
- 7 Densa

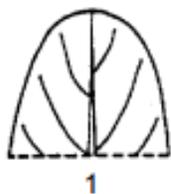
X31 Forma de la hoja madura

- 1 Oval
- 2 Corazonada
- 3 Corazonada larga
- 4 Corazonada ancha
- 5 Largo sagitado
- 6 Ancho sagitado
- 7 Hastada
- 99 Otro



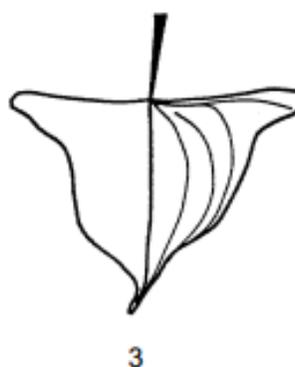
X32 Forma del ápice de la hoja madura

- 1 Obtuso
- 2 Agudo
- 3 Emarginado
- 99 Otro



X34 Distancia entre los lóbulos de la hoja madura

- 1 Sin distancia
- 5 Intermedia
- 9 Muy distante



X39 Posición de la parte más ancha de la hoja madura

- 1 Tercio superior
- 2 Medio
- 3 Tercio inferior

X40 Color de la punta de la hoja madura

- 1 Verde claro
- 2 Verde oscuro
- 3 Verde/morado
- 4 Roja
- 99 Otro

X41 Pilosidad del pecíolo de la hoja madura

- 3 Escasa
- 7 Densa

X45 Floración

- 0 Sin floración
- 1 Floración en algunos años
- 2 Floración todos los años

X47 Posición de la inflorescencia

(En relación con las ramas)

- 1 Hacia arriba
- 2 Hacia abajo

X49 Tipo de inflorescencia

- 1 Espiga
- 2 Racimo
- 3 Panícula
- 99 Otro



X50 Color de la flor

- 1 Morada
- 2 Blanca
- 3 Amarillenta
- 99 Otro

X51 Formación del fruto

- 0 No
- 1 Sí

X52 Desarrollo del Fruto

- 1 Casi siempre bien desarrollado
- 2 Casi siempre poco desarrollado

X53 Posición del fruto

- 1 Hacia arriba
- 2 Hacia abajo

X54 Forma del fruto

- 1 Longitud y anchura iguales
- 2 Alargado
- 3 Cápsula trilobulada

X55 Pilosidad del fruto

- 3 Escasa
- 7 Densa

X56 Ausencia/presencia de semillas en el fruto

- 0 Ausente
- 1 Presente

X57 Forma de la semilla

- 1 Alargada-oblonga
- 2 Redonda
- 99 Otro

X58 Estructura del ala de la semilla

- 1 Ala alrededor de todo el embrión
- 2 Ala en uno u otro lado del embrión
- 3 Ala sólo en un lado del embrión

X62 Altura del tallo maduro

- 1 <2 m
- 2 2-10 m
- 3 >10 m

X66 Diámetro del tallo maduro [cm]

Medido a 15 cm sobre la base de la planta

X76 Días hasta la floración después del brote

X77 Número de inflorescencias por planta

Observado en 10 plantas

1 10

2 11-29

3 30

X78 Longitud media de la inflorescencia

1 5 cm

2 6-10 cm

3 11-15 cm

4 16 cm

X79 Sexo

1 Femenino

2 Masculino

3 Femenino y masculino (predominantemente femenino)

4 Masculino y femenino (predominantemente masculino)

X80 Peso del tubérculo

X81 Largo del tubérculo

A 2 Lista de materiales utilizada en la determinación de variación intra e interespecífica en poblaciones *ex vitro* e *in vitro*.

Material *ex vitro*

N° de Identificación	Localidad	N° de Identificación	Localidad	N° de Identificación	Localidad
1	Acatic	35	Manzanilla de la Paz	69	Zapotlanejo
2	Acatic	36	Manzanilla de la Paz	70	Zapotlanejo
3	Acatic	37	Manzanilla de la Paz	71	Zapotlanejo
4	Acatic	38	Manzanilla de la Paz	72	Zapotlanejo
5	Acatic	39	Manzanilla de la Paz	73	Zapotlanejo
6	Chapala	40	Manzanilla de la Paz	74	Zapotlanejo
7	Chapala	41	Manzanilla de la Paz	75	Zapotlanejo
8	Chapala	42	Manzanilla de la Paz	76	Zapotlanejo
9	Chapala	43	Sn. Antonio	77	Zapotlanejo
10	Chapala	44	Sn. Antonio	78	Zapotlanejo
11	Cocula	45	Sn. Antonio	79	Autlán
12	Cocula	46	Sn. Antonio	80	Autlán
13	Cocula	47	Sn. Antonio	81	Autlán
14	Cocula	48	Sn. Antonio	82	Autlán
15	Cocula	49	Sn. Antonio	83	Autlán
16	Ixtlahuacán de los Membrillos	50	Sn. Antonio	84	Autlán
17	Ixtlahuacán de los Membrillos	51	Sn. Antonio	85	Autlán
18	Ixtlahuacán de los Membrillos	52	Sn. Antonio	86	Autlán
19	Ixtlahuacán de los Membrillos	53	Sn. Antonio	87	Autlán
20	Ixtlahuacán de los Membrillos	54	Sn. Antonio	88	Autlán
21	Ixtlahuacán del Rio	55	Sn. Gabriel	89	Autlán
22	Ixtlahuacán del Rio	56	Sn. Gabriel	90	Autlán
23	Ixtlahuacán del Rio	57	Sn. Gabriel	91	Sn. Martin Hidalgo
24	Ixtlahuacán del Rio	58	Sn. Gabriel	92	Sn. Martin Hidalgo
25	Ixtlahuacán del Rio	59	Sn. Gabriel	93	Sn. Martin Hidalgo
26	Ixtlahuacán del Rio	60	Sn. Gabriel	94	Sn. Martin Hidalgo
27	Ixtlahuacán del Rio	61	Sn. Gabriel	95	Sn. Martin Hidalgo
28	Ixtlahuacán del Rio	62	Sn. Gabriel	96	Sn. Martin Hidalgo
29	Ixtlahuacán del Rio	63	Sn. Gabriel	97	Sn. Martin Hidalgo
30	Ixtlahuacán del Rio	64	Sn. Gabriel	98	Sn. Martin Hidalgo
31	Ixtlahuacán del Rio	65	Sn. Gabriel	99	Sn. Martin Hidalgo
32	Ixtlahuacán del Rio	66	Sn. Gabriel	100	Sn. Martin Hidalgo
33	Manzanilla de la Paz	67	Zapotlanejo		
34	Manzanilla de la Paz	68	Zapotlanejo		

Material *in vitro*

N° de Identificación	Localidad	N° de Identificación	Localidad
101	Acatic	126	Manzanilla de la Paz
102	Acatic	127	Manzanilla de la Paz
103	Acatic	128	Manzanilla de la Paz
104	Acatic	129	Manzanilla de la Paz
105	Acatic	130	Manzanilla de la Paz
106	Chapala	131	Sn. Antonio
107	Chapala	132	Sn. Antonio
108	Chapala	133	Sn. Antonio
109	Chapala	134	Sn. Antonio
110	Chapala	135	Sn. Antonio
111	Cocula	136	Sn. Gabriel
112	Cocula	137	Sn. Gabriel
113	Cocula	138	Sn. Gabriel
114	Cocula	139	Sn. Gabriel
115	Cocula	140	Sn. Gabriel
116	Ixtlahuacán de los Membrillos	141	Autlán
117	Ixtlahuacán de los Membrillos	142	Autlán
118	Ixtlahuacán de los Membrillos	143	Autlán
119	Ixtlahuacán de los Membrillos	144	Autlán
120	Ixtlahuacán de los Membrillos	145	Autlán
121	Ixtlahuacán del Rio	146	Sn. Martin Hidalgo
122	Ixtlahuacán del Rio	147	Sn. Martin Hidalgo
123	Ixtlahuacán del Rio	148	Sn. Martin Hidalgo
124	Ixtlahuacán del Rio	149	Sn. Martin Hidalgo
125	Ixtlahuacán del Rio	150	Sn. Martin Hidalgo