



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS

**DISTINCIÓN, HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD (DHE)
MEDIANTE CARACTERIZACIÓN
MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN
VARIEDADES DE AMARANTO**

MA. ELENA RAMÍREZ

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:


DOCTORA EN CIENCIAS


MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO


2011

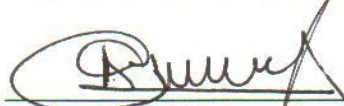
La presente tesis, titulada: **Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE) mediante caracterización morfológica y molecular en variedades de amaranto**, realizada por la alumna: Ma. Elena Ramírez, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:


DOCTORA EN CIENCIAS
POSTGRADO EN RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD
PRODUCCIÓN DE SEMILLAS
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO: 
DR. AQUILES CARBALLO CARBALLO

ASESOR: 
DR. AMALIO SANTACRUZ VARELA

ASESOR: 
DR. F. VÍCTOR CONDE MARTÍNEZ

ASESOR: 
DR. EDUARDO ESPITIA RANGEL

ASESOR: 
DR. FELIX V. GONZÁLEZ COSSÍO

Montecillo, Texcoco, Estado de México, julio de 2011

**DISTINCIÓN, HOMOGENEIDAD Y ESTABILIDAD (DHE) MEDIANTE
CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR EN VARIEDADES DE
AMARANTO**

Ma. Elena Ramírez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2011

Con el objetivo de valorar procedimientos para la evaluación de distinción, homogeneidad y estabilidad en variedades vegetales con fines de protección a los derechos del obtentor, se utilizaron 10 variedades de amaranto. Para el examen de distinción, se aplicó el sistema de agrupamiento del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas, además del Sistema Interanual de Distinción para seis caracteres cuantitativos, destacando que la calificación que se otorga a estos caracteres, no corresponde con los resultados obtenidos aplicando la diferencia mínima significativa. En cuanto a la homogeneidad, todas las plantas de una variedad resultaron muy parecidas entre sí; por otra parte, la estabilidad se evaluó mediante la homogeneidad de los caracteres de las variedades. La caracterización molecular se realizó empleando la técnica de intermicrosatélites. El ADN de las 10 variedades de amaranto se extrajo con el método de CTAB; la amplificación de los fragmentos se hizo mediante la PCR. La similitud genética se estimó mediante el coeficiente de Dice. Los dendrogramas de agrupación de las variedades de amaranto fueron derivados de la matriz de disimilaridad con el algoritmo *Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Clustering*, del sistema de análisis multivariado y taxonómico numérico utilizando el método del promedio aritmético no ponderado por pares (UPGMA). La confiabilidad del dendrograma se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos con Bootstrapping con 2000 remuestreos.

Palabras clave: Amaranto, caracterización, protección de variedades, DHE, intermicrosatélites.

**DISTINCTNESS, UNIFORMITY AND STABILITY (DUS) USING
MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF
AMARANTH VARIETIES**

Ma. Elena Ramírez, Dra.

Colegio de Postgraduados, 2011

In order to assess the procedures for distinctness, uniformity and stability testing in plant varieties related to breeder's rights protection 10 amaranth varieties were evaluated. For distinctness, the grouping system from the National Service of Seed Inspection and Certification was used along with the Distinctness Inter-annual System for six quantitative characteristics, pointing out that the grade given to the characteristics taken in the field do not correspond to varieties differentiation according to the least significant difference. As for uniformity, all the plants within a variety were very similar to each other; on the other hand, stability was tested through the uniformity of characters of the varieties. Molecular characterization was carried out using the inter-microsatellite technique. DNA from 10 amaranth varieties was extracted by the CTAB method. Fragments were amplified by PCR. Genetic similarity was estimated using the Dice coefficient. Dendrograms for grouping amaranth varieties were derived from the dissimilarity matrix using the Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Clustering algorithm as in the multivariate analysis and numerical taxonomy system, using the unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA). Dendrogram reliability was tested by bootstrapping re-sampling method on data matrices with 2000 re-sampling.

Key words: Amaranth, characterization, variety protection, DUS, inter-microsatellite

Agradecimientos

Al Colegio de Postgraduados, en especial al Postgrado en Producción de Semillas por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico recibido para cursar mis estudios de doctorado.

A la Coordinación del Convenio de Colaboración CP-SNICS, por brindarme la oportunidad de aprender, así como aportar y difundir conocimientos sobre la caracterización morfológica y molecular en variedades de amaranto.

Al Dr. Aquiles Carballo Carballo por su permanente dedicación e inagotable apoyo para el desarrollo de esta investigación; además de su enseñanza y su gran amistad e influencia en mi formación profesional; por ser un ejemplo de vida.

Al Dr. Amalio Santacruz Varela por su gran conocimiento, disposición y aportes en observaciones y sugerencias, que permitieron mejorar la calidad del proyecto de investigación; asimismo, por el tiempo dedicado a la revisión de la presente.

Al Dr. F. Víctor Conde Martínez por las correcciones y sugerencias brindadas en la realización del presente trabajo; por su apoyo en todo momento.

Al Dr. Eduardo Espitia Rangel gracias por sus comentarios, siempre oportunos y valiosos para la realización de este trabajo.

Al Dr. Félix V. González Cossío por sus enseñanzas y disposición en apoyarme siempre.

A la Dra. Reyna Isabel Rojas Martínez por su valiosa asesoría, confianza y facilidades concedidas para la realización de la caracterización molecular en el Laboratorio de Fitosanidad.

Al Dr. Humberto Vaquera Huerta por su gran disposición en orientarme y apoyarme en la parte estadística de la tesis.

Al M.C. Julio Arturo Estrada Gómez, M.C. Adrián Hernández Livera, M.C. Juan Virgen Vargas y al Dr. J. Apolinar Mejía Contreras, por su amistad y trato siempre cordial.

A las Secretarías: María Alicia Martínez Reyes, Irma Yolanda Carrillo Reyes y Dalila Torres Venegas, gracias por todo su apoyo.

Al personal del Área de Mejoramiento y Control de la Calidad Genética: Elías Zaragoza Ayala, Vicente Guerra Vázquez, Giovanni Guerra Vázquez, Christian Buendía Rojas y Sóstenes Hernández Néquiz por su importante y valioso apoyo en el establecimiento, mantenimiento, cosecha y limpieza de los experimentos de amaranto; además, por su permanente disposición al trabajo, con un trato siempre cordial.

A mis compañeros y amigos del Colegio de Postgraduados, y a todas aquellas personas que me distinguieron con su amistad y que de una u otra manera contribuyeron a llevar a buen fin este trabajo.

Dedicatoria

*A mi hijo **Ulises***

Con gran ternura, por ser un gran motivo de superación y por quien todo imposible vale la pena intentarlo

*A mi madre **Juana***

Con respeto y cariño por todo el apoyo otorgado durante la realización de mis estudios

*A mis hermanos: **José Gabriel, José Manuel y Nancy Irma***

Por los momentos compartidos durante nuestra niñez

*A **Susana, Graciela y Juan***

Por formar parte de nuestra familia

*A mis sobrinos que están físicamente cerquita de mí: **Patricia Gabriela, Cristian, Ma. Fernanda**
y **Jesús Alejandro**, gracias por todo su cariño y alegría!*

*A **Jesús Antonio, Diego Sebastián, Leonardo Daniel, Víctor Manuel, Nadia, Gabriela**
Montserrat, Sarita y Paulita, que aun en la distancia siempre los recuerdo con gran cariño*

¡Gracias!

ÍNDICE

	<u>Página</u>
RESUMEN GENERAL	ii
GENERAL ABSTRACT	iii
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS	x
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
ÍNDICE DE CUADROS DEL APÉNDICE	xiii
INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1. Objetivos	3
2. Hipótesis	3
3. Revisión de literatura	4
3.1 Taxonomía y caracteres botánicos del genero <i>Amaranthus</i>	4
3.2 Efectos del ambiente en amaranto	7
3.3 Variedades mejoradas en México	9
3.4 Distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE)	10
3.4.1 Distinción.....	10
3.4.2 Homogeneidad.....	10
3.4.3 Estabilidad.....	10
3.5 Marcadores bioquímicos y moleculares	11
3.5.1 Antecedentes.....	11
3.5.2 Definición.....	11
3.5.3 Marcadores bioquímicos.....	12
3.5.3.1 Proteínas de reserva.....	12
3.5.3.2 Isoenzimas.....	13
3.5.4 Marcadores moleculares.....	14
3.5.4.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP).....	14
3.5.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	15
3.5.4.3 Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD).....	17
3.5.4.4 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados	

(AFLP).....	18
3.5.4.5 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR).....	19
3.5.4.6 Intermicrosatélites o Inter secuencias simples repetidas (ISSR).....	21
4. Literatura Citada.....	23
CAPITULO I. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN VARIEDADES DE AMARANTO.....	29
1.1 Resumen.....	29
1.2 Abstract.....	30
1.3 Introducción.....	31
1.4 Materiales y Métodos.....	32
1.4.1 Localización de los experimentos.....	32
1.4.2 Material genético.....	32
1.4.3 Establecimiento de los experimentos.....	32
1.4.4 Evaluación de la Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE).....	33
1.4.5 Variables evaluadas.....	35
1.4.6 Cosecha.....	38
1.4.7 Análisis estadístico.....	38
1.5. Resultados y Discusión.....	40
1.5.1 Caracterización morfológica.....	40
1.5.2 Evaluación de la distinción.....	40
1.5.2.1 Análisis SISNAVA.....	40
1.5.2.2 Análisis COYD.....	47
1.5.2.3 Análisis de conglomerados.....	51
1.5.2.4 Análisis de componentes principales.....	55
1.5.3 Evaluación de la homogeneidad.....	60
1.5.4 Evaluación de la estabilidad.....	62
1.6 Conclusiones y Recomendaciones.....	62
1.7 Literatura citada.....	63

CAPITULO II. CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE AMARANTO POR INTER MICROSATÉLITES (ISSR).....	65
2.1 Resumen.....	65
2.2 Abstract.....	65
2.3 Introducción.....	66
2.4 Materiales y Métodos.....	69
2.4.1 Material genético.....	69
2.4.2 Extracción de ADN.....	70
2.4.3 Lavado de la pastilla de ADN.....	71
2.4.4 Calidad del ADN.....	71
2.4.5 Síntesis de ISSRs (Intermicrosatélites o Inter-repeticiones de secuencias simples).....	72
2.4.6 Mezcla de reacción y amplificación de fragmentos mediante PCR.....	72
2.4.7 Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados...	73
2.4.8 Análisis estadístico.....	74
2.5. Resultados y Discusión.....	75
2.5.1 Distinción de variedades de amaranto usando intermicrosatélites.....	75
2.5.2 Análisis de agrupamiento.....	79
2.6. Conclusiones.....	82
2.7. Literatura citada.....	82
DISCUSIÓN GENERAL.....	86
Literatura citada.....	92
APENDICE.....	94

ÍNDICE DE CUADROS

	<u>Página</u>
Cuadro 1.1	Variedades de amaranto utilizadas en el estudio..... 33
Cuadro 1.2	Caracteres utilizados para la descripción de variedades de amaranto..... 36
Cuadro 1.3	Análisis mediante el SISNAVA y comportamiento entre ambientes de 10 variedades de amaranto, a partir de las sumas de diferencias para todos los caracteres evaluados. Ambientes 1(C6-06), 2(C6-PF-07), 3(C6-SF-07), 4(PN-PF-07) y 5(PN-SF-07)..... 41
Cuadro 1.4.	Calificación y suma de diferencias en 10 caracteres cuantitativos para tres variedades evaluadas en cinco ambientes: 1(C6-06), 2(C6-PF-07), 3(C6-SF-07), 4(PN-PF-07) y 5(PN-SF-07)..... 44
Cuadro 1.5	Cuadrados medios del análisis de varianza de 10 variedades de amaranto y coeficientes de variación..... 47
Cuadro 1.6	Análisis Combinado Interanual de Distinción (COYD) en los ambientes de evaluación..... 48
Cuadro 1.7	Valores propios y porcentaje de la variabilidad que aportan los componentes principales generados con caracteres de la guía para la descripción varietal de amaranto..... 56
Cuadro 1.8	Vectores propios de los primeros cuatro componentes principales en 10 variedades de amaranto..... 57
Cuadro 2.1	Variedades de amaranto utilizadas en el estudio..... 69
Cuadro 2.2	Preparación de soluciones stock para la extracción de ADN..... 70
Cuadro 2.3	Reactivos para preparar el CTAB..... 70
Cuadro 2.4	Iniciadores y su secuencia..... 72
Cuadro 2.5	Composición de la reacción de PCR para obtener intermicrosatélites de amaranto..... 73
Cuadro 2.6	Condiciones de temperatura del termociclador para la amplificación de intermicrosatélites en variedades de amaranto..... 73
Cuadro 2.7	Iniciadores, secuencia, tamaño y número de bandas amplificadas..... 76

Cuadro 2.8	Coeficiente de similitud de Dice entre las variedades estudiadas.....	79
------------	---	----

ÍNDICE DE FIGURAS

		<u>Página</u>
Figura 1.1	Diferencias en la inflorescencia entre la variedad Maros (A) y Eniko (B).....	43
Figura 1.2	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote C6-06 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.....	52
Figura 1.3	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote PN-SF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.....	52
Figura 1.4	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote C6-PF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.....	53
Figura 1.5	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote PN-PF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.....	54
Figura 1.6	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote C6-SF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.....	54
Figura 1.7	Distribución de 10 variedades de amaranto sobre el plano cartesiano de los dos primeros componentes principales (1: Rojita, 2: Nutrisol, 3: Revancha, 4: Roza, 5: Reka, 6: Edit, 7: Maros, 8: Eniko, 9: Brs-Alegría, 10: Mariel).....	58
Figura 1.8	Análisis de conglomerados con distancia de vinculación individual utilizando la distancia euclidiana por el método de agrupamiento UPGMA en 10 variedades de amaranto. 1: Rojita, 2: Nutrisol, 3: Revancha, 4: Roza, 5: Reka, 6: Edit, 7: Maros, 8: Eniko, 9: Brs-Alegría, 10: Mariel.....	59
Figura 1.9	Distribución de los ambientes de evaluación en el plano cartesiano de los dos primeros componentes principales (1:C6-06, 2:C6-PF-07, 3:PN-PF-07, 4:C6-SF-07, 5:PN-SF-07).....	60
Figura 2.1	Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de escalera de peso molecular 1 Kb (0.5 µg/carril.).....	74
Figura 2.2	Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas por intermicrosatélites agrupadas con el método UPGMA utilizando el coeficiente de similitud de Dice.....	80

ÍNDICE DE CUADROS DEL APENDICE

	<u>Página</u>
1A. Caracterización de la variedad Rojita en siete ambientes.....	95
2A. Caracterización de la variedad Nutrisol en siete ambientes.....	96
3A. Caracterización de la variedad Revancha en siete ambientes.....	97
4A. Caracterización de la variedad Roza en seis ambientes.....	98
5A. Caracterización de la variedad Reka en siete ambientes.....	99
6A. Caracterización de la variedad Edit en siete ambientes.....	100
7A. Caracterización de la variedad Maros en siete ambientes.....	101
8A. Caracterización de la variedad Eniko en seis ambientes.....	102
9A. Caracterización de la variedad Brs-Alegría en seis ambientes.....	103
10A. Caracterización de la variedad Mariel en seis ambientes.....	104
11A. Bandas presentes (en bp) en 10 variedades de amaranto para cada uno de los iniciadores utilizados.....	105

INTRODUCCIÓN GENERAL

El cultivo del amaranto ha recobrado importancia por su alto contenido de proteína de buena calidad, así como de vitaminas y minerales que pueden constituir una fuente importante de alimentación en el futuro; siendo además que este cultivo nativo de México presenta una gran diversidad que está siendo aprovechada para implementar los programas de mejoramiento genético del cual se obtendrán nuevas variedades; las cuales, a la vez que las propias colectas requerirán de caracterizaciones morfológicas, además de considerar adicionalmente la adopción y estandarización de las técnicas moleculares para proponerlas a los organismos oficiales encargados de certificar y proteger las variedades vegetales, y de esta forma contar con la documentación necesaria que permita proteger tanto a las variedades mejoradas como al germoplasma nativo.

Las pruebas de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) son un componente esencial de una nueva variedad para obtener su registro oficial y la protección a los derechos del obtentor; siendo hasta ahora los caracteres morfológicos la base para el examen DHE.

Una variedad candidata para la protección debe de cumplir con los siguientes tres criterios: distinta, al considerar que sea claramente diferente de toda la colección de variedades de referencia; homogénea si, a reserva de la variación previsible habida cuenta de las particularidades de su reproducción sexuada o de su multiplicación, es suficientemente uniforme en sus caracteres; estable, si sus caracteres pertinentes se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones (UPOV, 2002). Los procedimientos anteriores son determinados por la Unión Internacional para la Protección de Variedades de Plantas (UPOV), de la cual México es miembro desde 1997. Este organismo ha desarrollado los procedimientos recomendados para los ensayos DHE y análisis estadísticos; además de las directrices para una gran variedad de cultivos de importancia económica.

La UPOV define a una variedad por sus caracteres (UPOV, 2004); sin embargo, el sistema para elaborar los exámenes DHE se ha ido complicando de muchas maneras; pues cada vez se incrementan las colecciones de referencia a nivel nacional e internacional, disminuyendo con esto la variabilidad dentro y entre especies; Además de incrementar los costos para cada una de

las evaluaciones, se requieren grandes extensiones de terreno, personal calificado y muchas veces, decisiones subjetivas (Cooke, 1995); muchas variedades presentan caracteres multigénicos o cuantitativos y su expresión se ve afectada por los factores ambientales; por lo tanto, para los propósitos de protección a los derechos del obtentor y en casos de uso indebido de una variedad, se debe esperar un ciclo de cultivo para obtener los resultados.

Por otra parte, la identificación y diferenciación de variedades es de vital importancia en gran parte del mundo, ya que es requisito indispensable para el registro en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales y su aplicación en la gestión de los Derechos del Obtentor. Este derecho de obtentor es un mecanismo de protección de variedades vegetales para la explotación comercial y es obligatorio para los países que son miembros de la Organización Mundial del Comercio (OMC) y de la cual México es miembro desde 1995; protección que es concedida si una variedad cumple con el examen DHE, mediante lo establecido por la UPOV (González, 1999).

Se han desarrollado diversas opciones, dando lugar a las caracterizaciones con marcadores moleculares para las pruebas DHE, las cuales ayudan a disminuir los costos y sobre todo el tiempo que conlleva cada uno de los ensayos para una caracterización morfológica.

La demanda para el desarrollo de una alternativa más rentable para los exámenes DHE dio lugar a estudios sobre el uso de marcadores moleculares, en particular para probar distinción entre variedades. La mayoría de los marcadores moleculares confirmaron un alto potencial, lo que conduce a la UPOV a considerar estas pruebas en los exámenes DHE. No obstante, antes de esta decisión hubo muchas cuestiones que resolver (Gunjaca *et al.*, 2008), como repetitividad de las diferentes técnicas de marcadores moleculares entre y en laboratorios, así como contratar personal calificado y laboratorios de referencia; sin embargo, la mejora en la tecnología, como es la amplificación de ADN por PCR, donde es posible la amplificación simultánea de más de una Secuencia Simple Repetida en una sola reacción, combinada con la utilización de la fluorescencia basada en la detección del fragmento de ADN y el tamaño del mismo, además de la rapidez y la precisión de esta técnica en la obtención de datos; ofrecieron un gran potencial para el análisis en la distinción de variedades (Mitchell *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares representan diferencias en las secuencias de nucleótidos que no son afectados por el ambiente ni por el estado de crecimiento (Kwon *et al.*, 2002); entre estos

marcadores se encuentran los intermicrosatélites o inter-secuencias simples repetidas (ISSRs) que han sido ampliamente reconocidos como un marcadores rápidos y eficaces en la genética para la toma de huellas, en los análisis filogenéticos y en estudios de diversidad genética (Bussell *et al.* 2005). La técnica de ISSRs consiste en la amplificación de segmentos de ADN entre dos microsatélites. El microsatélite usado como iniciador, generalmente está formado por secuencias cortas repetidas (1-6 pb) y se distribuyen ampliamente en el genoma de las eucariotas, por lo que puede mostrar polimorfismo en las plantas. Estos iniciadores pueden contener un ancla en los extremos 3' o 5', que contiene una, dos o tres pares de bases adicionales al microsatélite, con la que aumenta su especificidad.

Considerando lo anterior, se plantearon los siguientes objetivos:

1. Objetivos

1. Evaluar el comportamiento de caracteres descriptivos, en pruebas de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE) en variedades de amaranto.
2. Identificar y distinguir variedades vegetales de amaranto mediante la técnica de intermicrosatélites con fines de complementar con esta herramienta biotecnológica, la protección de nuevas variedades.

2. Hipótesis

1. Los caracteres morfológicos descriptivos están fuertemente influenciados por los efectos ambientales, y por ende, no son confiables en la pruebas DHE.
2. Por la ausencia de efectos ambientales en su expresión, los marcadores moleculares, son garantía de eficiencia y consistencia en los resultados de pruebas DHE.

3. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Taxonomía y caracteres botánicos del genero *Amaranthus*

La familia Amaranthaceae comprende 60 géneros y cerca de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical que se adaptan bien a climas templados. Los principales centros de distribución son los trópicos de América y la India, aún cuando en los trópicos de África y Australia existe un importante número de especies (Sauer, 1967; Feine *et al.*, 1979).

La familia del amaranto ha evolucionado en regiones cálidas, secas con suelos salinos, lo que da como resultado adaptaciones anatómicas y fisiológicas especiales, como la presencia de tricomas globuliformes que actúan como estructuras de secreción externa para eliminar las sales que se presentan en exceso en el suelo, cutícula gruesa, en algunas especies presencia de espinas y fijación del carbono atmosférico por la vía C_4 (Sauer, 1967; Feine *et al.*, 1979).

El género *Amaranthus*, aunque cosmopolita, es predominantemente tropical e incluye cerca de 50 especies nativas de los trópicos y de las regiones templadas de todo el mundo (Feine *et al.*, 1979); su clasificación taxonómica es difícil debido a que se han considerado para tal efecto características como la pigmentación, carácter que segrega demasiado entre las poblaciones, y el tamaño de la planta, que depende de la duración de la luz del día y de otras variables ambientales, además de que la planta de amaranto presenta mucha plasticidad (Espitia, 1986).

Diversos investigadores como Sauer (1967), Walton (1968) y Pal (1972), han buscado otros caracteres más constantes que faciliten la identificación de la especies; considerando tanto caracteres reproductivos como vegetativos.

Entre los rasgos reproductivos que son de valor taxonómico se encuentran las peculiaridades de la inflorescencia, de la flor estaminada y de la flor pistilada, destacando en esta última la relación de las brácteas con los tépalos y el gineceo fructificado, la forma y el tamaño de los tépalos de los frutos, y lo concerniente al grado de cobertura del gineceo fructificado y la forma y tamaño de las ramas estilo-estigmáticas. Los caracteres vegetativos de interés taxonómico son el ápice de la lámina y la longitud del peciolo (Hunziker, 1987).

El género se puede subdividir en dos subgéneros: *Amaranthus* (plantas monoicas) y *Acnida* (plantas dioicas). El subgénero *Amaranthus* se ha dividido en dos grupos con base en detalles morfológicos de la inflorescencia y de la flor (Koshoo y Pal, 1972): *Amaranthus* con inflorescencias grandes, terminales de crecimiento indeterminado (con excepción de *A. edulis*), las flores son pentámeras con un utrículo dehiscente y circunsésil, y *Blitopsis* Dumort con inflorescencias axilares de crecimiento determinado, y cuando existe un inflorescencia terminal, ésta es muy pequeña. Las flores son normalmente bímeras o trímeras con un utrículo dehiscente irregular (Robertson, 1981).

En la sección *Amaranthus* se incluyen las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. edulis*; son plantas con flores pentámeras e inflorescencia terminal de crecimiento indeterminado (excepto *A. edulis*) que se utilizan para producción de grano. Se incluyen también la mayoría de los ornamentales, muchos de los tipos para verdura y varios de los que se consideran malezas (Grubben y van Sloten, 1981). Mosyakin y Robertson (1996) incluyen a 3 subgéneros: *Acnida*, *Amaranthus* y *Albersia*.

Dentro del grupo para producción de grano se incluye a *A. hybridus*, el cual está siendo utilizado en los programas de mejoramiento genético para aprovechar algunas de sus características como precocidad y altura (Kauffman, 1981).

La sección *Blitopsis* incluye especies para verdura como *A. tricolor* y *A. blitum* L. (Grubben y van Sloten, 1981).

En la América precolombina se cultivaron tres especies para producción de grano: *A. caudatus* en los Andes, *A. cruentus* en América Central y *A. hypochondriacus* en México. Todas estas especies fueron descritas y nombradas por Linneo a partir de formas ornamentales cultivadas en los jardines europeos durante el siglo XVIII (Sauer, 1950; 1967).

Debido a la variabilidad existente dentro de las especies, ha sido necesario hacer subdivisiones: Sauer (1950) subdividió a *A. hypochondriacus* en tres razas: Común, Arizona y Aberrante; para *A. cruentus* señaló la Común y la Mexicana.

Hass (1979) realizó la clasificación de algunas especies de *Amaranthus* en tipos agronómicos con base en:

- a) Caracteres morfológicos como altura de planta, tamaño de la inflorescencia central, patrón de ramificación y número de flores pistiladas por glomérulo.
- b) Caracteres fenológicos como tiempo de floración y maduración.
- c) Origen geográfico
- d) Uso

De esta manera, para *A. hypocondriacus* propuso los tipo Enano de Nepal y el Alto de Floración Tardía; para *A. cruentus* el Mexicano y Africano; para *A. hybridus* el Bajo de Floración Temprana y para *A. caudatus*, Edulis y Típico.

Esta clasificación se ha modificado para incluir tipos que en un principio no se habían considerado o porque algunos han cambiado de nombre; Kauffman (1981) distingue el Nepal, el Arbustivo Tardío, el Azteca y el Picos en *A. hypocondriacus*; el Mexicano, Africano y Guatemalteco en *A. cruentus*, el Precoz en *A. hybridus* y el Sudamericano y Edulis en la especie *A. caudatus*.

La clasificación que se ha utilizado en la actualidad es la que describen Kauffman y Reider (1984), donde los tipos Azteca Nepal, Mercado, Mixteco y Picos pertenecen a *A. hypochondriacus*; los tipos Mexicano, Africano y Guatemalteco pertenecen a *A. cruentus*; el tipo Prima pertenece a *A. hybridus*; el Sudamericano y Edulis entran en *A. caudatus*; los tipos Azteca y Mixteco fueron sugeridos para clasificar los tipos de amaranto de la especie *A. hypochondriacus* con origen en el D. F., Estado de México, Tlaxcala y Puebla (Tipo Azteca) y los del Estado de Oaxaca (Tipo Mixteco), de acuerdo con las civilizaciones que florecieron en estos lugares en la época precolombina.

El término de grupos morfológicos fue propuesto por Kauffman (1992), a partir de la siembra de accesiones de semilla de color claro en los campos experimentales del Centro de Investigaciones de Rodale Research Center en Estados Unidos, pertenecientes a las especies de *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*, en las cuales se observaron similitudes y

diferencias entre caracteres fenotípicos muy obvios, así como en la respuesta a la longitud del día. A las accesiones que presentaron caracteres similares se les denominó “Grupo morfológico”.

Hoyt, citado por Kauffman (1992) indica que los grupos morfológicos representan una parte del espectro de variación genética de cada especie. Las accesiones dentro de un grupo son variantes que corresponden a razas locales del cultivo, desarrolladas a través del tiempo por la selección del agricultor, las cuales se encuentran totalmente adaptadas a las influencias de los humanos y del medio donde se desarrollaron.

Los grupos morfológicos representan clasificaciones preliminares, por lo que Espitia (1994) consideró necesario una caracterización para definir cada grupo morfológico de manera más clara. Propuso que los tipos de grano o grupos morfológicos representan una parte del espectro de la variación genética dentro de las especies. Las accesiones dentro de un grupo morfológico pueden ser consideradas como variedades nativas; que comprenden individuos domesticados de reproducción sexual con características que les permiten ser distinguidos de otros grupos. Consecuentemente, la designación más apropiada para los tipos de grano es el de raza; cada raza tiene una distribución definida y ha sido desarrollada bajo diferentes condiciones climáticas que hacen que la evolución de cada una de ellas sea diferente.

3.2 Efectos del ambiente en amaranto

El amaranto ha sido cultivado desde ambientes tropicales hasta tierras semiáridas, y desde el nivel del mar hasta algunas de las zonas agrícolas de mayor altitud en el mundo; sin embargo, tradicionalmente su cultivo se ubica dentro de los 30° de latitud (National Research Council, 1984).

Muchos amarantos son sensibles a la longitud del día; así *A. hypochondriacus* requiere de días cortos para poder alcanzar la madurez, en tanto que *A. cruentus*, que proviene de Nigeria, forma muy rápido las semillas cuando se coloca en condiciones de días muy largos, mientras que *A. caudatus* es reconocido como especie de días cortos, ya que usualmente florece y forma semillas únicamente cuando la longitud del día es menor a ocho horas. El amaranto crece satisfactoriamente desde el nivel del mar hasta los 3 200 m de altitud, pero únicamente *A. caudatus* prospera en altitudes sobre los 2 500 msnm. En general, el amaranto crece mejor

cuando la temperatura en forma cotidiana es de al menos 21°C, aunque *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* toleran altas temperaturas pero no resisten el frío, siendo *A. caudatus* más tolerante al frío que otras especies (National Research Council, 1984).

El cultivo del amaranto prospera en lugares cálidos con temperaturas altas, de 29 °C y en localidades templadas con temperaturas medias anuales de 14 °C, desde precipitaciones de 400 hasta 1 300 mm anuales (INEGI, 1998). Los inviernos definidos con heladas tempranas afectan principalmente al follaje, pero poco al grano. La temperatura óptima para la germinación es de 16 a 35 °C, su crecimiento cesa a los 8 °C y a los 4 °C se daña el cultivo (National Research Council, 1984).

Webb *et al.* (1984) realizaron estudios en dos zonas representativas de Montana, E. U. A. y determinaron que la temperatura mínima para *A. cruentus* del tipo Mexicano y Guatemalteco, *A. hypochondriacus* tipo Nepal y Spike es de 10 °C, mientras que Kigel (1994) menciona que las temperaturas mínima y máxima para la germinación del amaranto son aproximadamente de 10 °C y 45 °C, respectivamente. Dentro de estos valores de temperatura las semillas gradualmente se hinchan y ocurre la germinación al ser depositadas en el suelo. Por otro lado, el mismo autor indica que en el centro de los Estados Unidos, la temperatura óptima para la germinación del amaranto es de 18 a 21 °C, con suficiente humedad en el suelo, sembrando generalmente de mitad de mayo a mitad de junio; los rendimientos decrecen cuando se siembra a inicios de julio. Por su parte, Solberg (1982) menciona que el amaranto es una planta bastante adaptable a diferentes climas, ya que se obtuvo abundante cosecha en Fort Collins, Colorado, E.U.A., zona a 1,700 msnm, con variaciones de temperatura de 16.5 a 22 °C del día a la noche, desde mediados de junio hasta mediados de agosto.

Reyna (1988) menciona que el amaranto ha mostrado buen desarrollo desde lugares muy cálidos, con temperaturas altas de 29 °C, como en Atoyac, Gro., hasta en lugares templados (Tulyehualco y Milpa Alta, D. F.) con temperaturas medias de 14 °C, inviernos definidos y presencia de heladas tempranas que afectan al follaje principalmente, pero no al grano.

3.3 Variedades mejoradas en México

En México se tienen siete variedades mejoradas registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (SNICS, 2010):

La variedad mejorada Revancha que corresponde a *A. hypochondriacus* es derivada de la raza Mercado (Espita, 1991) cuyas principales características son: alto potencial de producción de grano (4518 kg/ha), precoz, con 131 días de período vegetativo, altura de planta adecuada para la mecanización del cultivo (137 cm) y uniformidad de maduración, además de otras características importantes como color verde de la planta, panoja erecta con pocas ramificaciones cortas, grano de color blanco y adaptación en zonas templadas a una altitud de 1400-2400.

La variedad Rojita, se obtuvo mediante evaluación de colectas y selección masal estratificada de la colecta 78S-125 y pertenece a la raza Nepal de la especie *A. hypochondriacus* L. Fue liberada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). La altura a la madurez de la planta fue de 137 cm en promedio y de la inflorescencia de 79 cm. La aparición de la inflorescencia se dio a los 60 días e iniciando la floración a los 72. La madurez fisiológica fue a los 122 días (Espitia *et al.* 2009).

La variedad Nutrisol se obtuvo mediante selección masal estratificada a partir de la colecta 666 originaria de San Miguel del Milagro, Tlaxcala; pertenece a la raza Azteca de la especie *A. hypochondriacus* L. Fue liberada por el INIFAP. Esta variedad es la más tardía de las variedades de referencia, ya que la aparición de la inflorescencia fue a los 75 días y el inicio de la floración a los 90 (Espitia *et al.* 2009).

La variedad Mariel, es producto del mejoramiento genético mediante selección individual realizada en Montecillo, México. Pertenece a la especie *A. cruentus*. Esta variedad se distingue del resto de las variedades registradas principalmente por presentar la inflorescencia de color amarillo; la madurez fisiológica es a los 124 días (SNICS, 2010).

Las variedades Calyecac, Cazadora y Yeztic, provienen de la identificación y registro de materiales nativos de la zona de Tulyehualco D. F. hechas por el Sistema Producto Amaranito del Distrito Federal, A.C. (SNICS, 2010).

3.4 Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE)

La descripción varietal y la estabilidad de los caracteres son de suma importancia para los esquemas y entidades de certificación de semillas; por lo que los artículos 7, 8 y 9 del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales, establecido el 2 de diciembre de 1961, revisado en Ginebra el 10 de noviembre de 1972, el 23 de octubre de 1978 y el 19 de marzo de 1991, definen lo siguiente:

3.4.1 Distinción

Se considerará distinta la variedad si se distingue claramente de cualquier otra variedad cuya existencia, en la fecha de presentación de la solicitud de evaluación, sea notoriamente conocida. En particular, el depósito, en cualquier país, de una solicitud de concesión de un derecho de obtentor para otra variedad o de inscripción de otra variedad en un registro oficial de variedades, se considerará que hace a esta otra variedad notoriamente conocida a partir de la fecha de la solicitud, si ésta conduce a la concesión del derecho de obtentor o a la inscripción de esa otra variedad en el registro oficial de variedades, según el caso.

3.4.2 Homogeneidad

Se considerará homogénea la variedad si es suficientemente uniforme en sus caracteres pertinentes, a reserva de la variación previsible habida cuenta de las particularidades de su reproducción sexual o de su multiplicación vegetativa.

3.4.3 Estabilidad

Se considerará estable la variedad si sus caracteres pertinentes se mantienen inalterados después de reproducciones o multiplicaciones sucesivas o, en caso de un ciclo particular de reproducciones o de multiplicaciones, al final de cada ciclo.

3.5 Marcadores bioquímicos y moleculares

3.5.1 Antecedentes

Claros (1998) menciona que las mejoras genéticas se han realizado desde la prehistoria, toda vez que se han seleccionado y mejorado especies vegetales, animales y microbianas basándose solamente en el fenotipo, esto gracias a la variabilidad genética y a la heredabilidad de caracteres morfológicos, lo cual requiere de observaciones exhaustivas de los organismos en diferentes estadios de desarrollo debido a las influencias ambientales.

Las proteínas de reserva e isoenzimas fueron los primeros marcadores desarrollados a finales de los 1960's. Con ellos se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico; sin embargo, no tenían la capacidad de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies cercanas ya que las proteínas son el resultado de la expresión génica, y esta difiere entre tejidos, en las etapas de desarrollo, entre ambientes y entre años de evaluación. Por otra parte, los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo estabilidad en la identificación de especies y variedades (Claros, 1998).

Los marcadores moleculares presentan mayor polimorfismo que los morfológicos; pueden ser evaluados desde estadios tempranos de desarrollo, la mayoría no interactúa con el ambiente; muchos de ellos detectan codominancia y en la actualidad, la tendencia es utilizarlos para detectar variabilidad a nivel de ADN.

3.5.2 Definición

Los marcadores moleculares han sido definidos como cualquier diferencia no típica controlada genéticamente directamente a nivel de ADN. Solís y Andrade (2005) mencionan que un marcador molecular es un carácter o un gen que debido al ligamiento indican la presencia de otro gen. Pueden corresponder a cualquier gen cuya expresión permite un efecto cuantificable u observable. Los marcadores genéticos se transmiten según las leyes básicas de la herencia

mendeliana, por lo que es importante considerar que no todos los tipos de marcadores pueden considerarse como genéticos.

Se puede considerar un marcador a cualquier molécula, orgánica o inorgánica, que sea característica de un organismo o proceso. Para Valadez y Kahl (2000) un marcador se refiere a cualquier molécula de proteína, ARN o ADN de tamaño o peso molecular conocido que sirve para monitorear o calibrar la separación de las mismas utilizando electroforesis o cromatografía, y un marcador genético como cualquier gen cuya expresión permite un efecto fenotípico que puede ser detectado fácilmente. Los marcadores de ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards 1997). Campos y Seguel (2000) mencionan que el uso de marcadores moleculares permite determinar una serie de interrogantes como: análisis de diversidad genética, estudios de relaciones filogenéticas entre especies y taxas superiores, identificación de materiales duplicados en las colecciones y análisis molecular de los procesos de regeneración de germoplasma.

3.5.3 Marcadores bioquímicos

Las proteínas de reserva y las isoenzimas, también llamadas aloenzimas, constituyen la primera generación de marcadores moleculares, desarrollados a finales de los 1960s, se basaron en la identificación de proteínas catalíticas en reacciones biológicas por electroforesis en geles de almidón o poliacrilamida (Claros, 1998).

3.5.3.1 Proteínas de reserva

El uso de las proteínas de reserva en sistemática y diversidad genética se basa en el hecho que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes; debido a que las proteínas de reserva carecen de actividad enzimática, éstas son detectadas en el gel por medio de técnicas generales de tñido (Becerra y Paredes, 2000); asimismo, las proteínas son definidas como productos primarios de los genes y se forman mediante los procesos de transcripción y traducción y son poco influenciados por el ambiente.

3.5.3.2 Isoenzimas

Tanksley *et al.* (1981) indican que los primeros marcadores bioquímicos usados en la genética de las plantas fueron las isoenzimas o aloenzimas y son aun las proteínas más ampliamente usadas. Fueron descubiertas por Hunter y Markert (1957) y son diferentes variantes moleculares de una misma enzima presentes en una misma especie; desempeñan la misma actividad pero con diferentes propiedades.

Jarret y Litz (1986) mencionan los diversos sistemas enzimáticos que se emplean frecuentemente como el malato deshidrogenasa, fosfoglucomutasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, shikimato deshidrogenasa y peroxidasa. Su análisis se realiza extrayendo la enzima de los tejidos de la planta, tras lo cual, las variantes son separadas con electroforesis y visualizadas mediante la tinción del gel con colorantes específicos (Powell, 1992; Haines, 1994).

Una isoenzima es un variación de una enzima que comparten el mismo sustrato pero con diferente movilidad electroforética; las isoenzimas incluyen todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes loci (isoenzimas propiamente dichas) o por alelos diferentes en el mismo locus (aloenzimas); se encuentran en diferentes individuos en una misma población y pueden tener diferentes formas moleculares de la misma proteína; esta variación en cuanto a la estructura de las proteínas es producida por factores genéticos o epigenéticos (Powell, 1992; Haines, 1994).

Claros (1998) indica que con el desarrollo de marcadores basados en la identificación de proteínas e isoenzimas se abrió el conocimiento de la estructura y heterogeneidad genética entre diferentes especies, variedades, y poblaciones de distinto origen geográfico; sin embargo, esta técnica no es capaz de detectar suficiente polimorfismo entre variedades o especies próximas debido a que las proteínas son el resultado de la expresión génica, que puede ser distinta de unos tejidos a otros, de una etapa de desarrollo a otra y de un medio ambiente a otro. Los avances de la tecnología del ADN recombinante han permitido el desarrollo de los marcadores moleculares basados en el ADN, consiguiendo mayor estabilidad en la identificación de especies y variedades.

3.5.4 Marcadores moleculares

Valadez y Kahl (2000) mencionan que estas técnicas están basadas en los análisis de los ácidos nucleicos y detectan variaciones directas a nivel de ADN conocidas como huellas.

Becerra y Paredes (2000) indican que el polimorfismo basado en proteínas ha sido de gran utilidad en las investigaciones realizadas en plantas, pero con el desarrollo de las tecnologías basadas en ADN, la investigación en esta área se ha visto favorecida con la disponibilidad de una mayor cantidad de marcadores; aquellos basados en el polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Ambas técnicas han derivado en múltiples técnicas como son la amplificación de ADN al azar (RAPD), fragmentos polimórficos de ADN amplificados (AFLP), minisatélites (VNTR) y microsateélites (SSR), entre otros.

Mediante huellas genéticas de ADN, Sun *et al.* (1999) realizaron comparaciones de índices de similitud genética de *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. quitensis*, e identificaron a *A. hybridus* como el progenitor más probable de las especies de amaranto para grano: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*.

3.5.4.1 Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP)

En 1970, la técnica con RFLP se usó en los programas de investigación para el mapeo físico de adenovirus (Grodzicker *et al.*, 1974). Claros (1998) indica que esta técnica se basa en la detección de fragmentos de ADN de distinto peso molecular en diferentes organismos. Los fragmentos más fáciles de analizar son los pequeños, derivados de la digestión del genoma de las mitocondrias o de los cloroplastos; asimismo, indica que las deleciones, sustituciones o mutaciones pueden alterar significativamente el patrón de bandas identificable por electroforesis en geles de agarosa, donde éstas migran de acuerdo con su peso molecular; en cambio, para moléculas de ADN de mayor tamaño, como el ADN cromosómico, el patrón de bandas es tan complejo que es necesario utilizar sondas específicas para visualizar sólo ciertos fragmentos mediante la técnica de Southern Blot. Las sondas de ADN para esta técnica suelen corresponder a genes previamente conocidos, aunque a veces se usan ADN preparados a partir de amplificaciones inespecíficas. Aunque el RFLP evalúa sólo un tipo de polimorfismo en cada

ensayo, el resultado es muy preciso. Los primeros mapas genómicos basados en la distribución física de los genes en vez de la frecuencia de entrecruzamiento se hicieron utilizando esta técnica. Cuando se emplea la PCR en lugar de sondas radiactivas para visualizar los polimorfismos, se le denomina PCR-RFLP.

Valadez y Kahl (2000) definen los RFLPs como la variación en la longitud de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADNs genómicos de dos ó más individuos de una especie. Los RFLPs se generan por rearrreglos o mutaciones que dan lugar a la creación o deleción de sitios de reconocimiento para las endonucleasas específicas. Estas variaciones también pueden deberse a la presencia de ADN repetido con diferente cantidad de copias sobre una región cromosómica específica. El concepto principal fue que la mutación en el sitio de restricción, o la mutación que altera la distancia entre los sitios adyacentes de restricción podrían ser visualizadas como “Marcadores de ADN”. Para realizar el análisis se necesitan las enzimas de restricción. Paterson (1996) menciona que éstas actúan como “tijeras moleculares” altamente específicas. La alta especificidad para reconocer secuencias es la base para la mayoría de estrategias para clonar ADN. La gran mayoría de las enzimas de restricción utilizadas en el clonaje molecular reconocen secuencias de cuatro, cinco ó seis nucleótidos de longitud. Después de la publicación de Botstein *et al.* (1980) los RFLPs han sido ampliamente usados en plantas con diferentes objetivos: caracterización de germoplasma, estudios filogenéticos, pureza de semillas híbridas, selección y/o localización de genes específicos (mediante análisis de ligamiento) de características agronómicas importantes, etc. (Phillips-Mora *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

3.5.4.2 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue inventada por Saiki *et al.* (1985) y fue descrita por Kary Mullis en 1985 (Leyva y Martínez, 2001). Claros (1998) menciona que la PCR fue descrita en 1988 y es una de las técnicas esenciales para la preparación de huellas.

La PCR es una reacción enzimática en la cual un segmento de ADN de una región específica del genoma de la especie se amplifica (copia) de manera cíclica en una mezcla de reacción *in vitro*; lo anterior permite un aumento exponencial del segmento seleccionado de

ADN, llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aún cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentraciones muy bajas (Saiki *et al.*, 1988).

La ADN polimerasa es una enzima que, en determinadas condiciones y en presencia de una cadena de ADN, actúa como cebador, y es capaz de producir millones de copias de determinados fragmentos del ADN. Estos fragmentos se separan posteriormente por peso molecular mediante técnicas electroforéticas, obteniéndose un patrón de bandas específico que permite diferenciar individuos (Rallo *et al.*, 2000).

La reacción básica de la PCR comienza con la desnaturalización del ADN molde para separar las cadenas, continúa con el alineamiento de un par de oligonucleótidos con el ADN molde, y termina con la polimerización para sintetizar un nuevo ADN entre los dos oligonucleótidos. De aquí se vuelve a la desnaturalización para comenzar un nuevo ciclo (Claros, 1998).

El análisis PCR es un procedimiento *in vitro* para la síntesis y duplicación de secuencias específicas de ADN. Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis de fragmentos de ADN de longitudes variables, no mayores de 6 Kb en promedio (Valadez y Kahl, 2000).

Según la técnica, se usan uno o dos oligonucleótidos sintéticos (iniciadores), generalmente de entre 10 a 30 pares de bases de longitud y complementarios a la secuencia nucleotídica de los extremos del ADN blanco y diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada uno de los cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Valadez y Kahl, 2000).

Una de las propiedades importantes de la PCR, es el diagnóstico para amplificar una secuencia blanco a partir de una preparación cruda de ADN; es decir, ADN obtenido con un método estándar de extracción sin recurrir a un protocolo sofisticado de purificación (Valadez y Kahl, 2000).

3.5.4.3 Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

Esta técnica se desarrolló en 1990 y es una de las más versátiles. Se usa una colección de decanucleótidos para amplificar por PCR áreas específicas distribuidas al azar en el genoma (Claros, 1998).

En los RAPDs se utilizan iniciadores aleatorios, donde los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas, no involucra la transferencia tipo Southern y son una herramienta para generar mapas genéticos y analizar relaciones taxonómicas (Valadez y Kahl, 2000). El análisis RAPD requiere de cinco elementos básicos:

- 1) ADN molde: ADN proveniente de la muestra a analizar.
- 2) El iniciador: es un oligonucleótido, con la propiedad de localizar y unirse a sitios complementarios del ADN desnaturalizado. Debe tener un contenido de al menos un 50% de guanina-citocina para funcionar correctamente.
- 3) Desoxirribonucleótidos: se requiere de concentraciones adecuadas de dATP, dGTP, dCTP y de dTTP para la síntesis de la cadena.
- 4) Solución buffer.
- 5) Taq-polimerasa: es una enzima ADN polimerasa termoestable. Tiene la propiedad de restituir la doble cadena de ADN usando una cadena simple como molde a partir de un punto determinado, fijado en este caso, por el iniciador (Phillips-Mora *et al.*, 1995).

En amaranto (*Amaranthus* spp.), se analizaron 60 poblaciones silvestres mediante RAPDs, determinándose una elevada variabilidad entre las distintas accesiones, un importante grado de homogeneidad genética dentro de ellas y un mayor polimorfismo entre las accesiones herbáceas silvestres cultivadas (Chan y Sun, 1997). La elevada variabilidad observada entre las formas herbáceas se relaciona con el escaso o nulo mejoramiento genético efectuado sobre ellas y la mínima presión de selección ejercida por el hombre durante su cultivo; mientras que Transue *et al.* (1994), en un estudio de *Amaranthus* spp, usando RAPDS clasificaron eficientemente accesiones por especies a través de su morfología.

Los RAPDs en comparación con los RFLPs, generan un número inmenso de marcadores y no requieren de sondas específicas para cada especie y la cantidad de ADN necesaria para el análisis es mucho menor (Phillips-Mora *et al.*, 1995).

La eficiencia de los marcadores RAPDs puede estar influenciada por varios factores, entre ellos el número de ciclos de amplificación, la cantidad de ADN inicial, la longitud del ADN, el iniciador y la temperatura (Phillips-Mora *et al.*, 1995).

3.5.4.4 Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados (AFLP)

Dehmer (2003) indica que 40 accesiones de amaranto de 13 especies diferentes fueron examinadas por AFLP y la diversidad en este género fue determinada. El fenograma obtenido de un total de 893 fragmentos presentó correspondencia perfectamente a lo descrito durante el mejoramiento: *A. retroflexus*, *A. palmeri*, *A. rudis*, *A. albus*, *A. blitoides*, *A. gracilis*, *A. tricolor*, *A. viridis*, *A. quitensis*, *A. powellii*, *A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

Lin *et al.* (1996) mencionan que los AFLP pueden proveer más información que varios otros sistemas moleculares como los RAPDs o RFLP y son altamente reproducibles; por su parte, Wassom y Tranel (2005) mencionan que las especies de *Amaranthus* son genéticamente muy similares y así es más probable de producir híbridos viables; estimaron el polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) basado en el análisis de conglomerados de agrupación jerárquica por el método de la media no ponderada (UPGMA); analizaron 8 especies, con 141 especímenes representados por 98 accesiones. Los análisis agruparon los especímenes dentro de cuatro grupos principales integrados por: 1) *A. palmeri* S. Wats. y *A. spinosus* L. 2) *A. powellii* S. Wats., *A. retroflexus* L. y *A. hybridus* L., 3) *A. tuberculatus* (Moq.) Sauer, y *A. arenicola* I. M. Johnst. y 4) *A. albus* L.

Xu y Sun (2001) han usado con éxito los AFLP para determinar que existe una relación cercana entre *A. caudatus* y *A. quitensis*, colocando a *A. hybridus* en el mismo grupo que el resto de amarantos de grano, e indicando que *A. powellii* representa el taxón más divergente en el complejo de especies de *A. hybridus*.

Costea *et al.* (2006) realizaron un estudio con accesiones de *Amaranthus* “Morelos” de México demostrando una taxonomía ambigua en el nivel morfológico básico. La principal causa es la enorme variación genética y morfológica exhibida por las especies de este género. Aunque básicamente, los criterios morfológicos pueden aplicarse a especímenes de herbario y colecciones de germoplasma para una rápida identificación taxonómica, los datos morfológicos pueden ser engañosos. La acertada identificación taxonómica coloca a las accesiones de ‘Morelos’ con las especies *A. caudatus* y *A. cruentus*, mediante análisis de relaciones filogenéticas usando AFLP y métodos micromorfológicos. Con los resultados obtenidos con los AFLP, todas las accesiones controversiales de “Morelos” fueron colocadas consistentemente dentro de *A. cruentus* con clara separación de *A. caudatus*. Lo anterior es base para futuros estudios de micromorfología, y la combinación de estas técnicas puede proveer mejor información que cualquiera de las dos metodologías por separado para la identificación del germoplasma.

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia; sin embargo, la técnica es más complicada de ejecutar que la de los RAPD y SSR; además, requieren una mayor cantidad de ADN (Karp *et al.*, 1997).

Valadez y Kahl (2000) mencionan que los AFLPs surgen a partir de:

- a) Polimorfismos en los sitios de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción está presente o ausente.
- b) Polimorfismos en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie (“tandem”) tienen sitios variables.
- c) Cambios en los pares de bases de ADN asociados con sitios de restricción.

3.5.4.5 Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

Los microsatélites o repeticiones de secuencias simples (SSR) son regiones de secuencias pequeñas (dos a cinco pares de bases) repetidas y arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas al azar por todo el genoma. Son secuencias de ADN altamente variables dispersas a través de los genomas de los organismos vivos, las cuales pueden o no estar asociadas con genes; son loci altamente mutables que pueden estar presentes en muchos sitios

del genoma. Dado que la repetición por sí misma no codifica para formar ninguna proteína, y debido a que las secuencias de ADN repetitivo pueden recombinarse y expandirse más frecuentemente que otros tipos de secuencias, estas regiones son a menudo altamente variables y consecuentemente útiles para medir el polimorfismo entre especies o variedades muy relacionadas (Phillips-Mora *et al.*, 1995; Valadez y Kahl, 2000).

Los microsatélites son útiles en los programas de mejoramiento, análisis de germoplasma e identificación varietal. Mallory *et al.* (2007) produjeron un sistema de marcadores altamente informativos y reproducibles para las especies de amaranto de grano. En adición, 20 iniciadores fueron diseñados e identificados para loci de microsatélites y secuenciados nuevamente para desarrollar una biblioteca BAC de amaranto. Todos los iniciadores de los diversos amarantos para grano y de sus parientes silvestres fueron colocados en un panel. Un total de 181 (59%) fueron polimórficos en todos los amarantos colocados en el panel. Entre estos loci polimórficos, el número de alelos para las especies de grano tienen un intervalo de 2 a 8 con un promedio de 4 alelos por locus. La amplitud de los valores heterocigóticos va de 0.13 a 0.84, con un valor promedio de 0.62. El primer mapa de los amarantos para grano consiste en estos marcadores y AFLPs, y actualmente inicia su desarrollo.

Recientemente, cada vez más microsatélites, o repeticiones de secuencia simple (SSRs) se han encontrado y se han caracterizado dentro de los genes y de sus regiones sin traducir (UTRs) de la codificación para una proteína (Li *et al.*, 2004).

Maughan *et al.* (2007) están desarrollando herramientas moleculares necesarias en amaranto, incluyendo marcadores moleculares (microsatélites) y bibliotecas de BAC para ayudar a la caracterización y a la conservación del germoplasma, así como para identificar ligamiento genético, aislamiento de genes y reproducción.

Sobre el estatus del desarrollo de los marcadores y del proyecto de la biblioteca BAC, un total de 1472 clones de ADN de tres microsatélites de *A. hypochondriacus* (AAC, AAT, CA) que han enriquecido a la biblioteca genómica fueron secuenciados; de éstos, 356 contienen repeticiones y no son redundantes. El análisis de hibridación indicó que la biblioteca contiene menos del 7% de ADN extranuclear (plastidios/mitocondria).

La tecnología para el análisis de microsatélites es similar a la utilizada para el análisis RAPD, con la adición de una evaluación y secuenciación previa para determinar los iniciadores. La detección del polimorfismo SSR se realiza mediante una reacción de PCR y la separación de los productos mediante electroforesis en geles de agarosa, poliacrilamida o geles de secuenciación. Las variaciones detectadas por los SSR son el resultado de cambios en el número de unidades repetidas (Lowe *et al.*, 2004).

3.5.4.6 Intermicrosatélites o Intersecuencias Simples Repetidas (ISSRs)

Existe una técnica alternativa y con diferente capacidad informativa a los microsatélites, siendo esta las intersecuencias simple repetidas (ISSRs), los cuales detectan regiones de ADN comprendidas entre dos microsatélites con núcleos que comparten la misma secuencia de bases.

Los ISSRs fueron utilizados por primera vez por Zietkiewicz *et al.* (1994) y se han propuesto como una fuente nueva de marcadores moleculares porque superan algunas de las limitaciones técnicas de los RFLP y RAPD (Ratnaparkhe *et al.*, 1998) y han ido cobrando importancia por su aplicación práctica, versatilidad, y por la cantidad de información que pueden proporcionar ya que estos resultaron ser más polimórficos que los RAPD al realizar una caracterización genética en piña (Tapia *et al.*, 2005).

La amplificación con ISSRs es una técnica que puede diferenciar rápidamente entre individuos estrechamente relacionados. Esta técnica involucra el diseño de primers o iniciadores como si fueran un subgrupo de los microsatélites (SSR) y sólo amplifican la región entre dos espacios muy cercanos, opuestamente orientados a los SSR. (Zietkiewicz *et al.*, 1994)

En la técnica de ISSRs se utilizan iniciadores, y la secuencia debe estar formada por di- o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El primer es complementario a una región microsatélite blanco, y el nucleótido extra permite la amplificación solamente si el primer se pega a la terminación 5' del microsatélite con un primer nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora. Tales nucleótidos extras juegan el papel de "anclas" y aseguran que la amplificación inicie siempre del extremo 5' del microsatélite. En donde el primer localiza dos regiones microsatélite separadas por una secuencia genómica amplificable del ADN blanco, la

reacción de PCR generará una banda de tamaño particular para ese “locus”, representando el fragmento de ADN que se encuentra entre los microsatélites (Bornet y Branchard, 2001)

Debido a que una muestra particular de ADN presenta varias áreas de microsatélites “pareadas”, los ISSRs frecuentemente amplifican de 25 a 50 “bandas” en una sola reacción. Los polimorfismos que se obtienen se originan gracias a los cambios en los nucleótidos que sirven como “anclas”. Las bandas obtenidas son analizadas como marcadores dominantes, lo cual significa que cada banda corresponde a un locus. La presencia de la banda representa el genotipo dominante (tanto homocigoto, como heterocigoto), mientras que un blanco representa el genotipo homocigoto recesivo. Esto es válido si se asume que solamente existen dos alelos por locus.

La ausencia de una banda puede deberse a varios factores:

- 1) La no existencia de un sitio de unión completo debido a una mutación.
- 2) Rearreglos estructurales en el cromosoma durante la meiosis.
- 3) Inserciones o deleciones lo suficientemente grandes como para aumentar o disminuir el tamaño de la banda, lo que dificulta identificarlas como un locus separado.

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad, dada principalmente a las altas temperaturas de alineación de la PCR. Además, para diseñar los primers no es necesario conocer secuencias del genoma del organismo en estudio, por lo que se ha utilizado ampliamente en estudios de variación genética entre individuos muy cercanos y en la identificación de variantes con importancia agrícola (Nagaoka y Ogihara, 1997).

Las desventajas que presentan este tipo de marcadores genéticos son dos principalmente. La primera se refiere a la seguridad que se pueda tener con respecto a si las bandas del mismo tamaño molecular presentes en varios individuos son homólogas, y la segunda se relaciona con la información incompleta que arrojan dichos marcadores dada su naturaleza dominante, ya que los heterocigos no pueden ser distinguidos.

La técnica de las ISSRs tiene una alta reproducibilidad, alto polimorfismo y los resultados se obtienen en un tiempo muy corto, además de que su costo es menor a los SSR. Las ISSRs se han convertido en una herramienta eficiente y eficaz para la fidelidad clonal y la cartografía del genoma. La amplificación del ADN mediante ISSRs es muy eficiente y caracteriza la presencia de bandas progenitor masculino y femenino específicas, logrando así determinar la hibridación en plantas de la F₁ de especies de *Brassica* (Gupta *et al.*, 2004).

4. Literatura Citada

- Becerra V., V. y M. Paredes C. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica (Chile)* 60(3): 270-281.
- Bornet, B. y M. Branchard, 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215
- Botstein, D., R. L. White, M. Skolnick, and R. W. Davies. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 32: 314-331.
- Bussell, J.D., M. Waycott, and J.A. Chappill. 2005. Arbitrarily amplified DNA markers as characters for phylogenetic inference. *Perspectives Plant Ecol., Evol. Syst.* 7:3-26.
- Campos Q., H. e I. Seguel B. 2000. Biotecnología y recursos genéticos vegetales. *Agro Sur (Chile)* 28(1): 13-24.
- Chan, K. F. y M. Sun. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* 95: 865-873.
- Claros D., M. G. 1998. Marcadores moleculares: qué son, cómo se obtienen, y para qué valen. *Encuentros en la Biología* 49. Universidad de Málaga. Disponible en línea: <http://www.encuentros.uma.es/encuentros49/marcadores.html> (Consultado 25 de octubre de 2010).
- Cooke, R. J. 1995. Varietal identification of crop plants. *In: New Diagnostics in Crop Sciences.* Skerritt, J. H. and R. Appels (eds.). CAB Int. Wallingford. pp. 33-63.
- Costea, M., D. M. Brenner, F. J. Tardif, Y. F. Tan and M. Sun. 2006. Delimitation of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus caudatus* L. using micromorphology and AFLP

- analysis: an application in germplasm identification. *Genetic Resources and Crop Evolution*. 53: 1625-1633.
- Dehmer, K. J. 2003. Molecular diversity in the genus *Amaranthus*. *In: Schriften zu Genetischen Ressourcen*. Knüpfner, H., J. Ochsmann (eds.). Band 22. Rudolf Mansfeld and Plant Genetic Resources. Zadi, Bonn, Germany. pp. 208-215.
- Espitia R., E. 1991. Revancha: variedad mejorada de amaranto para los valles altos. Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos. p. 64.
- Espitia R., E. 1994. Breeding of grain amaranth. *In: O. Paredes-López*. (ed.). *Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. CRC Press Inc. Boca Raton, FL. pp. 23-38.
- Espitia Rangel. E., D. Escobedo López y A. J. Gámez Vázquez. 2009. Catalogo de Productos y Servicios 2009: Valles Altos de la Región Centro. Catálogo No. 2 CIR Centro INIFAP. Chapingo, México. 156 p.
- Feine, L., R. R. Harwood, C. S. Kauffman, and J. P. Senft 1979. Amaranth; gentle giant of the past and future. *In: New Agricultural Crops*. G. A. Ritchie (ed.). A.A.A.S. Selected Symposium 38. Westview Press. Boulder, CO. pp. 41-63.
- González M., A. 1999. Propiedad intelectual, diversidad biológica y desarrollo sustentable. *Espacios* 20(3) 1.999
- Grodzicker, T., J. Williams, P. Sharp, and J. Sambrook. 1974. Physical mapping of temperature-sensitive mutations of adenoviruses. *In: Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 39: 439-446.
- Grubben, G. J. H. and D. H. van Sloten. 1981. Genetic resources of amaranths. A global plan of action. *Internacional Board for Plant Genetic Resources*. Rome, Italy. 63 p.
- Gunjaca J., I. Buhinicek, M. Jukic, H. Sarcevic, A. Vragolovic, Z. Kozic, A. Jambrovic and I. Pejic. 2008. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica* 161: 165–172.
- Gupta K., D. Prem, M. S. Negi and A. Agnihotri. 2004: ISSRs: An efficient tool to characterize interspecific F₁ hybrids of Brassica species. *In: New Directions for a Diverse Planet*. Proceedings for the 4th International Crop Science Congress. Fischer, T., N. Turner, J. Angus, L. McIntyre, M. Robertson, A. Borrell and D. Lloyd (eds.). 26th Sept-1st Oct. 2004, Brisbane, Australia.
- Haines, R. 1994. Biotechnology in forest tree improvement: with special reference to developing countries. *FAO Forestry Paper 118*. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), Rome. 230 p.

- Hass, P. W. 1979. The Rodale germplasm collection. Proceedings of the Second Amaranth Conference. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. pp. 135 –141.
- Hunter R. L. and C. L. Market. 1957. Histochemical demonstration of enzymes separated by zone electrophoresis in starch gels. *Science* 125(3261): 1294-1295.
- Hunziker, A. T. 1987. Taxonomía de las especies de amarantos cultivados y de los silvestres relacionados. *En: A. D. Holding and G. Covas (eds.). Actas de las Primeras Jornadas Nacionales sobre Amarantos. Universidad Nacional de la Pampa. Santa Rosa, La Pampa, Argentina. p. 10.*
- INEGI. 1998. Producción, industrialización y comercialización del amaranto en el Distrito Federal. Dirección General Centro – INEGI. Subdirección de Apoyo Técnico; Departamento de Agropecuarios. Notas. *Revista de Información y Análisis. 6: 38-46.*
- Jarret, R. L. and R. E Litz. 1986. Isozymes as genetic markers in bananas and plantains. *Euphytica* 35(2): 539-549.
- Karp, A. and K. J. Edwards. 1997. DNA markers: a global overview. *In: DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews. G. Caetano-Anollés, P.M. Gresshoff (eds.). Wiley-Liss Inc. New York. pp. 1-13.*
- Karp, A., S. Kresovich, K. V. Bhat, W. G. Ayad, and T. Hodgkin. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. IPGRI Technical Bulletin No. 2. International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy. 47 p.
- Kauffman, C. S. 1981. Grain Amaranth Varietal Improvement: Breeding Program. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. 24 p.
- Kauffman, C. S. 1992. The status of grain amaranths for the 1990's. *Food Reviews International* 8: 165-185.
- Kauffman, C. S. and C. Reider. 1984. Rodale Amaranth Germ Plasm Collection. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. 81 p.
- Khoshoo, T.N. and M. Pal. 1972. Cytogenetic patterns in *Amaranthus*. *Chromosomes Today. 3:259-267.*
- Kigel, J. 1994. Development and ecophysiology of amaranths. *In: Amaranth Biology, Chemistry and Technology. Paredes-López, O. (ed.). CRC Press Inc. Boca Raton, FL. pp. 39-73.*
- Kwon, Y. S., K. M. Kim, D. H. Kim, M. Y. Eun, and J. K. Sohn. 2002 Marker-assisted introgression of quantitative trait loci associated with plant regeneration ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells* 14: 24–28.

- Leyva L., N., E., y J. P. Martínez S. 2001. Manual de procedimientos. Curso de fitopatología molecular. Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. CINVESTAV-DGSV. México, D. F. p. 7.
- Li, Y. C., A. B. Korol, T. Fahima, and E. Nevo. 2004. Microsatellites within genes: structure, function and evolution. *Molecular Biology and Evolution* 21(6): 991-1007.
- Lin, J. J., J. Kuo, J. Ma, J. A. Saunders, H. S. Beard, M. H. MacDonald, W. Kenworthy and B. F. Matthews. 1996. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Mol. Biol. Reporter* 14: 156-169.
- Lowe, A., S. Harris and P. Ashton. 2004. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Science. Victoria, Australia. 326 p.
- Mallory, M. A., R. K. Vivas, M. N. Karanu, J. B. Alvarez, E. N. Jellen, M. R. Stevens, D. J. Fairbanks, and P. J. Maughan. 2007. Development of microsatellite markers for the grain amaranths (*Amaranthus*). International Plant & Animal Genomes XV Conference. January 13-17, 2007. San Diego, CA. p. 147.
- Maughan, P. J., E. N. Jellen, M. A. Mallory, and D. B. Pratt. 2007. Development of molecular tools for understanding the amaranth genome-molecular markers and BAC library development. International Plant & Animal Genomes XV Conference. January 13-17, 2007. San Diego, CA. p. 434.
- Mitchell S. E., S. Kresovich, C. A. Jester, C. J. Hernandez, and A. K. Szewc-McFadden. 1997. Application of multiplex PCR and fluorescence-based, semi-automated allele sizing technology for genotyping plant genetic resources. *Crop Sci.* 37:617-624
- Mosyakin, S. L. and K. R. Robertson (1996). New infrageneric taxa and combinations in *Amaranthus* (Amaranthaceae). *Ann. Bot. Fennici* 33: 275-281.
- Nagaoka, T. and Y. Ogihara, 1997. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 597-602.
- National Research Council. 1984. *Amaranth: Modern Prospects for an Ancient Crop*. National Academy Press. Washington, D. C. 81 p.
- Pal, M. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. I. Breeding system and inflorescence structure. *Proc. Indian Nat. Sci. Acad.* 38B: 28-37.
- Paterson, A. H. 1996. *Genome Mapping in Plants (Biotechnology Intelligence Unit)*. Academic Press. San Diego, California, USA. 330 p.

- Phillips-Mora, W., H. Rodríguez, y P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie Técnica. Informe Técnico No. 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.
- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers and linkage maps. *In: Biotechnology and Crop Improvement in Asia*. Moss, J. P. (ed.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, India. pp. 297-322.
- Rallo P., A. Belaj, R. de la Rosa, e I. Trujillo. 2000. La biotecnología prepara el olivo del siglo XXI. Revista Almazara de Extremadura (España). Mayo-junio de 2000. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm (Consultado 29 de octubre, 2010).
- Ratnaparkhe, M. B., M. Tekeoglu, and F. J. Muehlbauer. 1998. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theor. Appl. Gen.* 97:515-519.
- Reyna T., T. 1988. Investigaciones Recientes sobre Amaranto. Instituto de Geografía. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F. 101 p.
- Robertson, K. R. 1981. The genera of Amaranthaceae in the Southeastern United States. *Journal of The Arnold Arboretum* 62: 267-313.
- Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of the DNA with thermostable DNA polymerase. *Science* 239(4839): 487-491.
- Saiki, R. K., S. Scharf, F. Faloona, K. B. Mullis, G. T. Horn, H. A. Erlich, and N. Arnheim. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230(4732): 1350-1354.
- Sauer, J. D. 1950. The grain Amaranths a survey of their history and classification. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 37: 561-632.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographical survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54: 103-137.
- SNICS. 2010. Catalogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV). Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Tlalnepantla, Edo. de México. 34 p.
- Solberg, G. 1982. Grain amaranth in the desert. *Dry Country News* 80(4): 13-16.
- Solís R., L. Y. y A. Andrade T. 2004. ¿Que son los marcadores moleculares? *Ciencia y Hombre. Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana* XVIII (1).

<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>
(Consultado 25 de octubre de 2010).

- Sun, M., H. Chen, and F.C. Leung. 1999. Low-Cot DNA sequences for fingerprinting analysis of germplasm diversity and relationships in *Amaranthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 99 (3-4): 464-472.
- Tanksley, D., H. Medina-Filho, and C. M. Rick. 1981. The effect of isozyme selection on metric characters in an interspecific backcross of tomato—basis of an early screening procedure. *Theoretical and Applied Genetics* 60: 291-296.
- Tapia C., E., H. Guillén A. y M. A. Gutiérrez E. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas* spp.) mediante RAPD e ISSR. *Rev. Fitotec. Mex.* 28: 187-194.
- Transue, D. K., D. J. Fairbanks, L. R. Robison, and W. R. Andersen. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop. Sci.* 34: 1385-1389.
- UPOV. 2002. Introducción general al examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales. UPOV/TG/3/1. Ginebra. 21 p.
- UPOV. 2004. Documento conexo a la Introducción General al Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad y a la Elaboración de Descripciones Armonizadas de las Obtenciones Vegetales (documento TG/1/3). UPOV/TGP/7/1. Ginebra. 21 p.
- Valadez M., E. y G. Kahl. 2000. Huellas de ADN en Genomas de Plantas (Teoría y Protocolos de Laboratorio). Editorial Mundi-Prensa. México, D.F. 147 p.
- Walton, P. D. 1968. The use of *Amaranthus caudatus* in simulating the breeding behavior of commercial *Gossypium* species. *J. Hered.* 59: 17-18.
- Wassom, J. J. and P. J. Tranel. 2005. Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species. *Journal of Heredity* 96(4): 410-416.
- Webb, D. M., J. R. Schaeffer and C.W. Smith. 1984. Screening of grain amaranth for adaptation to Montana, USA. *Proceedings of the Third Amaranth Conference*. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. pp. 201-211.
- Xu, F. and M. Sun. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 372-387.
- Zietkiewicz E., A. Rafalski and D. Labuda. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.

CAPITULO I.

CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA EN VARIEDADES DE AMARANTO

1.1 Resumen

Con el objetivo de valorar procedimientos para la evaluación de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) en variedades vegetales con fines de protección a los derechos de obtentor, en este trabajo se utilizaron 10 variedades de amaranto. Para el examen de la distinción se utilizó el sistema de agrupamiento del Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas; resultando que ocho de diez variedades cumplen con la distinción, pero dos de ellas (Roza y Brs-Alegría) resultaron morfológicamente parecidas. Las variedades Maros y Eniko resultaron iguales; no obstante, ambas muestran rasgos que las distinguen; con respecto a la homogeneidad, las variedades expresaron en cada ambiente los caracteres que las definen sin la presencia de plantas atípicas; sin embargo, no cumplen con la estabilidad aquellos que son cuantitativos con medición de varias plantas o partes de plantas individuales. Se evaluaron seis caracteres mediante el análisis combinado interanual de distinción, destacando que la calificación que se otorga a los caracteres tomados en campo, no corresponden a la diferenciación de una variedad de acuerdo a la prueba DMS. Por otra parte, los dendrogramas mostraron que las variedades Rojita, Edit y Reka se agrupan, pues comparten siete caracteres esenciales al igual que el grupo formado por Revancha, Maros y Eniko; mientras que Nutrisol, Brs-Alegría y Roza, son similares en ocho caracteres esenciales; la variedad Mariel forma por sí sola un grupo, ya que es distinta en la mayoría de los caracteres, principalmente en el carácter 24: IC. El Análisis de Componentes Principales sólo considera 27 caracteres, e indica que los primeros 21 explican el 83.30 % del total de la variación, y que con éstos es factible desarrollar la caracterización en variedades de la especie *Amaranthus*.

Palabras clave: Derechos de obtentor, DHE, variedades de amaranto

1.2 Abstract

Ten amaranth varieties were used in order to assess the procedures for evaluation of distinctness, uniformity and stability in plant varieties in relation to breeder's rights protection. For the distinctness test the grouping system of the National Service of Seed Inspection and Certification was used; eight out of ten varieties complied with distinction, while two of them (Roza and Brs-Alegría) do not, because they were morphologically similar. Maros and Eniko varieties displayed the same results; nevertheless, both show some traits that distinguish them. In relation to uniformity the varieties expressed in each environment the characteristics that define them without the presence of off-types; however, those that are quantitative involving measurement of several plants or parts of individual plants do not meet stability. Six characters were evaluated through the distinctness inter-annual combined analysis; pointing out that the grade assigned to those characters taken in the field does not correspond to variety differentiation according to the LSD test. On the other hand, dendrograms show that Rojita Edit and Reka varieties grouped together, because they share seven essential characters, as the group integrated by Revancha, Maros and Eniko. Nutrisol, Brs-Alegría and Roza are similar in eight essential characters; Mariel variety forms a group by itself, because it is different in most characteristics, mainly in the 24: IC one. The principal component analysis considered only 27 characteristics and indicates that the 21 explain 83.30% of the total variation and that with them it is feasible to develop characterization in varieties from *Amaranthus* species.

Keywords: Morphological characterization, DUS, amaranth varieties.

1.3 Introducción

El cultivo de amaranto presenta en común diversos rasgos morfológicos, siendo estos algunos de los múltiples caracteres que se pueden usar para definir razas dentro de las especies, a partir del origen geográfico y de su morfología. Kauffman y Reider (1984) fueron los primeros en agrupar accesiones basadas en caracteres morfológicos. La descripción de los tipos de grano fue considerada y basada en la experiencia de las observaciones sobre un gran número de accesiones a través de muchas estaciones de crecimiento.

La diversidad genética del cultivo de amaranto se evalúa con base en la caracterización del germoplasma por medio de caracteres de alta y baja heredabilidad a través del fenotipo, siendo la principal limitante en esta caracterización, la influencia ambiental.

La clasificación taxonómica del amaranto es difícil debido a que se han considerado para tal efecto características como la pigmentación, carácter que segrega demasiado entre las poblaciones, y el tamaño de la planta, que depende de la duración de la luz del día y de otras variables ambientales, además de que la planta de amaranto presenta mucha plasticidad fenotípica (Espitia, 1986).

El género *Amaranthus* se ha cultivado desde los 7,000 a 5,000 años A. C. En África, América Central, Asia, México y Sudamérica se han reemplazado los materiales criollos por selecciones cuyas características son prometedoras para obtener cultivos más homogéneos y de mayor producción (Kulakow y Hauptli, 1994).

Desde tiempos prehispánicos, el amaranto ha tenido gran relevancia en México por el uso en rituales religiosos y como parte de la dieta. En la actualidad su importancia radica en su alto contenido proteínico y por el porcentaje alto de aminoácidos esenciales para el hombre; en este sentido, las especies más importantes en la producción de grano son: *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus* (Coimbra y Salema, 1994).

Las pruebas de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) representan el componente esencial para obtener el registro y la protección de una variedad; sustentado por caracteres morfológicos. Una variedad debe de cumplir los siguientes tres criterios 1) distinta, al considerar

que sea claramente diferente de toda la colección de variedades de referencia; 2) uniforme si las plantas fuera de tipo no exceden el mínimo permitido y si sus caracteres se mantienen a través de los diversos ambientes y en el tiempo; 3) estable, si se mantienen todos los caracteres a través de sus reproducciones sucesivas. Los procedimientos anteriores son delineados por la Unión Internacional para la Protección de Variedades de Plantas (UPOV), de la cual, México es miembro desde 1997. Este organismo ha desarrollado todos los procedimientos recomendados para los ensayos DHE y análisis estadísticos; además de las directrices para evaluación en la mayoría de los cultivos de importancia económica.

Dada la necesidad de probar la efectividad de los procedimientos de evaluación basados en caracteres morfológicos, con fines de identidad y distinción; en el presente trabajo se planteó como objetivo el evaluar el comportamiento de caracteres descriptivos de amaranto en pruebas de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad.

1.4 Materiales y Métodos

1.4.1 Localización de los experimentos

La caracterización morfológica se realizó en los ciclos primavera-verano 2006 y 2007 en dos lotes del Campo Experimental del Colegio de Postgraduados en Montecillo, Texcoco, Estado de México, localizado a los 19° 27' 53'' de Latitud Norte, 98° 54' 05'' de Longitud Oeste, y a una altitud de 2240 msnm.

1.4.2 Material Genético

El material vegetal utilizado fue de ocho variedades de referencia y dos variedades candidatas de *Amaranthus hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus* provenientes de 3 países distintos (Cuadro 1.1).

1.4.3 Establecimiento de los experimentos

En el ciclo agrícola P-V 2006, la unidad experimental fue de 5 surcos de 5 m de longitud y 0.80 m de ancho, con fecha de siembra del 18 de mayo, mientras que en el ciclo agrícola P-V 2007, en el primer lote experimental (Lote C-6) la unidad experimental consistió de dos

surcos de 9 m con 0.80 m de separación, además de dos surcos libres entre variedades; y en el segundo lote experimental (Lote Predio Nuevo) se utilizaron parcelas de 5 surcos con una longitud de 5 m y 0.80 m de separación entre ellos. Los experimentos se establecieron en tres fechas de siembra: 18 de mayo, 18 de junio y 31 de julio y fueron las mismas en ambos lotes; la siembra se hizo en forma manual, depositando la semilla a chorrillo en el lomo del surco; posterior a la emergencia, se realizó un aclareo dejando una planta cada 40 cm. No se utilizó un diseño experimental, dado que los caracteres propios de las variedades de amaranto se calificaron conforme a la Guía para la Descripción Varietal de Amaranto TG/247/1 (UPOV, 2008a), y sólo en los caracteres con tipo de expresión QN y con tipo de observación MS se caracterizaron 20 plantas o partes de plantas.

Cuadro 1.1. Variedades de amaranto utilizadas en el estudio.

No. de variedad	Variedad	País de procedencia	Estatus de la variedad
1	Rojita	México	Referencia
2	Nutrisol	México	Referencia
3	Revancha	México	Referencia
5	Roza	Hungría	Referencia
5	Reka	Hungría	Referencia
6	Edit	Hungría	Referencia
7	Maros	Hungría	Referencia
8	Eniko	Hungría	Referencia
9	Brs-Alegría	Brasil	Candidata
10	Mariel	México	Candidata

1.4.4 Evaluación de la Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE)

La evaluación morfológica de las variedades de amaranto se realizó de acuerdo al examen de la distinción, homogeneidad y estabilidad y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales, de la Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV, 2002) y que enseguida se describen:

a) Material vegetativo

Se utilizó material vegetal representativo acorde a los lineamientos de la UPOV para el examen DHE de las variedades candidatas, éste se encontró visiblemente en buen estado, sin carencia de vigor y no estuvo afectado por plagas o enfermedades.

b) Diferencias consistentes

Los lineamientos de la UPOV indican que las diferencias observadas entre variedades pueden ser tan evidentes que no sea necesario más de un ciclo de cultivo. No obstante, debe prevalecer el criterio de que una manera de garantizar que una diferencia observada en un ensayo sea lo suficientemente consistente, es examinar el carácter en al menos dos ciclos de cultivo independientes.

c) Diferencias claras

Determinar si una diferencia entre dos variedades es clara depende de muchos factores y, para ello se consideró el tipo de expresión del carácter; es decir, si éste se expresa de manera cualitativa, cuantitativa o pseudocualitativa; por consiguiente, es importante estar familiarizados con las recomendaciones contenidas en el documento que aborda estos aspectos (UPOV, 2002) antes de tomar decisiones relativas a la distinción.

d) Análisis de la distinción

La examinación de distinción se realizó en relación con todas las variedades notoriamente conocidas y no fue necesario efectuar una comparación individual respecto de las mismas; acorde al criterio de que cuando una variedad candidata es suficientemente diferente en la expresión de sus caracteres como para garantizar su distinción respecto de un grupo (o grupos) particular, no habrá que efectuar una comparación individual sistemática con las variedades de ese grupo o grupos.

e) Análisis de la homogeneidad

La homogeneidad se evaluó mediante la observación y cuantificación de plantas fuera de tipo, cuando en lo general todas las plantas de una variedad son muy parecidas entre sí.

f) Evaluación de la estabilidad

Con base a que en la práctica, no es común efectuar exámenes de estabilidad que registren resultados tan confiables como los de un examen de la distinción y homogeneidad; según la UPOV, la experiencia ha demostrado que, en muchos tipos de variedades, cuando una variedad haya demostrado ser homogénea, también puede considerarse estable; sin embargo, cuando proceda, o en caso de duda, se examinará la estabilidad cultivando una generación complementaria o examinando un nuevo lote de semillas o plantas para verificar que se presentan los mismos caracteres que el material suministrado anteriormente.

1.4.5 Variables evaluadas

Para la evaluación de la DHE, se registraron caracteres cualitativos, cuantitativos y pseudocualitativos; teniendo en cuenta que los caracteres cualitativos son los que se expresan en niveles discontinuos, sus niveles de expresión se explican por sí mismos y tienen un significado independiente; por otra parte, los caracteres cuantitativos abarcan toda la gama de variaciones, la expresión puede inscribirse en una escala unidimensional lineal continua o discontinua; en tanto que en los caracteres pseudocualitativos, la gama de expresión es parcialmente continua.

Para la caracterización, se utilizó la Guía para la Descripción Varietal de Amaranto TG/247/1 (UPOV, 2008a); la cual comprende 40 caracteres (Cuadro 1.2) que se deben calificar en las distintas etapas de desarrollo fenológico: plántula, planta joven (6-8 hojas), aparición de inflorescencia, inicio de la floración, madurez fisiológica y al momento de la cosecha; después de la trilla y limpieza, se calificó forma, tipo y color de la semilla.

Cuadro 1.2. Caracteres utilizados para la descripción de variedades de amaranto.

Número de carácter y tipo de expresión	Tipo de observación y etapa fenológica	Nombre del descriptor y abreviatura	Nivel de expresión
1. (* QL	VG (a)	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	1 y 9
2. (* QL	VG (a)	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	1 y 9
3. QN	VG (a)	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	3, 5 y 7
4. QN	MS (b)	Hoja joven: longitud (HJL)	3, 5 y 7
5. QN	MS (b)	Hoja joven: anchura (HJA)	3, 5 y 7
6. QN	VG (b)	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	3, 5 y 7
7. QN	VG (b)	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	1, 2 y 3
8. QN	VG (b)	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	3, 5 y 7
9. PQ	VG (b)	Hoja joven: color principal del haz (HJCPh)	1, 2, 3, 4 y 5
10. PQ	VG (b)	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDsch)	1, 2 y 3
11. PQ	VG (b)	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1, 2 y 3
12. QL	VG (c)	Hoja: margen (HM)	1 y 2
13. QN	VS	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3, 5 y 7
14. QN	MG	Época de floración (EF)	3, 5 y 7
15. PQ	VG (d)	Tallo: color (TC)	1, 2, 3, 4 y 5
16. PQ	VG (d)	Tallo: color de las rayas (TCR)	1, 2 y 3
17. (* QL	VG (d)	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1 y 9
18. QN	VG (d)	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	1, 3, 5, 7 y 9
19. PQ	VG (d)	Limbo: color principal (LCP)	1, 2, 3 y 4
20. (* QL	VG (d)	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1 y 9

Cuadro 1.2. Continuación...

Número de carácter y tipo de expresión	Tipo de observación y etapa fenológica	Nombre del descriptor y abreviatura	Nivel de expresión
21. QN	VG (d)	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	3, 5 y 7
22. PQ	VG (d)	Limbo: color de la mancha (LCM)	1, 2, 3 y 4
23. (* (QL)	VS (d)	Limbo: forma de la mancha (LFM)	1 y 2
24. (* PQ	VG (d)	Inflorescencia: color (IC)	1, 2, 3, 4, 5 y 6
25. QN	VG (d)	Inflorescencia: compacidad (ICOM)	3, 5 y 7
26. QN	VG (d)	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	3, 5 y 7
27. (* QL	VG (d)	Inflorescencia: tipo (IT)	1 y 2
28. QN	MS (d)	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	3, 5 y 7
29. (* QN	VG (d)	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3, 5 y 7
30. (* QL	VG (d)	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1 y 2
31. QN	VG (d)	Inflorescencia: porte (IP)	1, 2 y 3
32. QN	VG (d)	Inflorescencia: longitud (IL)	3, 5 y 7
33. QN	MG (e)	Planta: época de madurez (PEM)	3, 5 y 7
34. QN	MG (e)	Planta: longitud (PL)	3, 5 y 7
35. (* QL	VG (e)	Tallo: pigmentación antocianica de la base (TPAB)	1 y 9
36. (* QL	VG (e)	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	1 y 2
37. (* PQ	VG (f)	Semilla: color (SC)	1, 2, 3, 4 y 5
38. (* PQ	VG (f)	Semilla: forma (SF)	1 y 2

Cuadro 1.2. Continuación...

Número de carácter y tipo de expresión	Tipo de observación y etapa fenológica	Nombre del descriptor y abreviatura	Nivel de expresión
39. (* QL	VG (f)	Semilla: tipo (ST)	1 y 2
40. QN	MG (f)	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	3, 5 y 7

(*) Carácter esencial; (QL) Carácter cualitativo, (QN) Carácter cuantitativo, (PQ) Carácter pseudocualitativo; MG: medición única de un grupo de plantas o partes de plantas, MS: medición de varias plantas o partes de plantas individuales, VG: evaluación visual mediante una única observación de un grupo de plantas o partes de plantas, VS: evaluación visual mediante observación de varias plantas o partes de plantas individuales; (a) Observaciones de la plántula que deberán realizarse 3-6 días después de la despuntadura, (b) Observaciones de la plántula que deberán realizarse en plantas jóvenes con 6-8 hojas, (c) Las observaciones deberán realizarse en la fase vegetativa justo antes de la despuntadura de las inflorescencias, (d) Las observaciones deberán realizarse en la época de la plena floración: 50% de las plantas, (e) Las observaciones deberán realizarse en la época de madurez fisiológica y (f) Las observaciones deberán realizarse en la época de la cosecha de semillas secas.

1.4.6 Cosecha

En el año 2006 se usaron los tres surcos centrales como parcela útil para eliminar la posibilidad de cosechar semilla con contaminación entre las variedades colindantes; asimismo, de los extremos de los surcos se eliminaron las primeras cinco plantas. De la parcela útil, se seleccionaron diez plantas representativas de cada variedad, mismas que fueron trilladas por separado; de éstas se tomaron 200 gramos para determinar la forma, color y tipo de semilla.

En el año 2007 la cosecha fue completa en las variedades del lote C-6, ya que por la diferencia en las fechas de siembra y por los dos surcos de separación entre variedades, se consideró poco probable el cruzamiento entre ellas. En el Lote Predio Nuevo la parcela útil fue de sólo un surco, ya que por la falta de aislamiento los dos surcos de cada lado probablemente se encontraban contaminados, con excepción de las variedades Edit y Nutrisol, que se cosecharon de manera completa, pues por su ciclo vegetativo era poco probable el cruzamiento con las otras.

1.4.7 Análisis estadístico

Para determinar la distinción, se utilizó el Sistema para el Agrupamiento de Variedades (SISNAVA), de uso interno del SNICS (Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas); este sistema se basa en la suma de diferencias que se presentan entre los niveles de

expresión de un carácter que definen a una variedad. Para hacer este análisis, se consideraron sólo cinco ambientes, puesto que en la prueba de la tercera fecha en ambos lotes sólo se tomaron datos hasta la fase de floración, ya que la presencia de heladas tempranas impidió la finalización en la calificación de caracteres de las variedades. Para otorgar la calificación de un carácter se consideró la moda.

Los datos obtenidos fueron analizados con el paquete computacional de NTSYS-pc (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System) versión 2.2R (Rohlf, 1993).

Se elaboraron dendrogramas de agrupación para las variedades a partir de la disimilaridad con el programa SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nested Cluster Analysis) (Dunn y Everitt, 1982) del programa NTSYS.pc 2.2R (Rohlf, 1993), por medio del método del promedio no ponderado por pares con medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Means) (Adams *et al.*, 2000).

La confiabilidad de cada dendrograma se probó mediante el remuestreo en las matrices de datos con Bootstrapping con $\alpha=0.05$, con 2000 remuestreos y por medio de una matriz de comparación entre la matriz de similitud generada por la matriz básica de datos y de una matriz promedio generada con el remuestreo con Bootstrap, realizado mediante el paquete NTSYS (Rohlf, 1993).

Adicionalmente se empleó el Análisis Combinado Interanual de Distinción (COYD), en el que se considera la variación entre años de los caracteres cuantitativos; este análisis de basa en el análisis de varianza para obtener la diferencia mínima significativa con una t_p de Tablas t de Student $p=0.01$, fue generado por el TWC (Grupo de Trabajo en Cómputo y Sistemas) (UPOV, 2004b).

Además de lo anterior, también se realizó un análisis de componentes principales (ACP), usando la matriz de correlaciones mediante el Sistema de Análisis Estadístico (SAS) versión 9.1. Los datos no se estandarizaron para este propósito, ya que fueron los obtenidos de acuerdo a la nota numérica que indica la Guía para la descripción varietal de amaranto (UPOV/247/1, 2008a). Adicionalmente, se realizó un análisis de conglomerados utilizando el paquete estadístico MINITAB; la disimilitud se calculó usando la distancia euclidiana y el método algorítmico de

componentes principales, usando la distancia de vinculación individual con un nivel de similitud del 70%.

1.5 Resultados y Discusión

1.5.1 Caracterización morfológica

Las pruebas de DHE son un paso esencial para que una nueva variedad sea considerada candidata a ser registrada como tal, a la vez que con este procedimiento se documenta la factibilidad por lograr la protección de los derechos del obtentor. Bajo este esquema, el obtentor debe caracterizar la nueva variedad tal como lo indica la UPOV en el acta de 1991, además el obtentor debe demostrar que ésta cumple con el examen DHE: distinción de todas la demás variedades ya conocidas al momento de presentar la solicitud de registro, homogénea en todos sus caracteres y presentar estabilidad a través de los diversos ambientes de evaluación y/o producción.

Para que una variedad sea distinta, la UPOV indica que basta la diferencia en un solo carácter, no obstante, el SNICS considera una suma de diferencias mayor a 10 con todos los caracteres, cuando ocurre que la suma de diferencias es menor o igual a 10 se analizan de manera específica estas diferencias, si son caracteres cualitativos, pseudocualitativos o cuantitativos, y en caso de que sean cuantitativos e influenciados por el ambiente se solicita al obtentor proporcione caracteres adicionales que ayuden a diferenciar de una mejor manera a la variedad. La caracterización morfológica se muestra en los cuadros 1A al 10A del Apéndice.

1.5.2 Evaluación de la distinción

1.5.2.1 Análisis SISNAVA

En la Cuadro 1.3 se observan las diferencias obtenidas de las 10 variedades evaluadas en cinco ambientes; destacando que la mayor distancia morfológica la presentan las variedades Mariel y Nutrisol con 77 unidades absolutas, en tanto que la más reducida se encuentra entre las variedades Brs-Alegría y Roza con cero unidades.

Cuadro 1.3. Análisis mediante el SISNAVA y comportamiento entre ambientes de 10 variedades de amaranto, a partir de las sumas de diferencias para todos los caracteres evaluados. Ambientes 1(C6-06), 2(C6-PF-07), 3(C6-SF-07), 4(PN-PF-07) y 5(PN-SF-07).

1	BRS_Alegría_C6_06	1
2	BRS_Alegría_C6_PF_07	6 0 3
3	BRS_Alegría_C6_SF_07	4 2 0 4
4	BRS_Alegría_PN_PF_07	6 4 6 0 5
5	BRS_Alegría_PN_SF_07	6 8 6 4 0 6
6	Edit_C6_06	28 30 28 26 22 0 7
7	Edit_C6_PF_07	26 28 26 28 24 2 0 8
8	Edit_C6_SF_07	24 26 24 26 26 4 2 0 9
9	Edit_PN_PF_07	26 28 26 24 24 2 4 2 0 10
10	Edit_PN_SF_07	26 28 26 24 24 2 4 2 0 0 11
11	Eniko_C6_06	32 38 36 34 30 27 29 31 29 29 0 12
12	Eniko-C6-PF-07	26 28 26 28 28 29 27 25 27 27 10 0 13
13	Eniko-C6-SF-07	28 26 28 26 30 31 29 27 29 29 12 2 0 14
14	Eniko-PN-PF-07	26 28 30 28 32 33 31 29 31 31 10 4 2 0 15
15	Eniko-PN-SF-07	30 32 34 28 32 33 35 33 31 31 6 8 6 4 0 16
16	Maríel-C6-06	48 50 52 50 54 49 47 45 47 47 38 36 34 32 36 0 17
17	Maríel-C6-PF-07	48 42 44 46 50 49 47 45 47 47 42 32 30 32 36 8 0 18
18	Maríel-C6-SF-07	48 42 44 46 50 49 47 45 47 47 42 32 30 32 36 8 4 0 19
19	Maríel-PN-PF-07	44 42 44 42 46 45 43 41 43 43 38 28 26 28 32 8 4 4 0 20
20	Maríel-PN-SF-07	44 42 44 42 46 45 43 41 43 43 38 28 26 28 32 8 4 4 0 0 21
21	Maros-C6-06	29 31 33 27 31 30 32 30 28 28 7 9 7 5 5 31 35 35 31 31 0 22
22	Maros-C6-PF-07	27 25 27 25 29 32 30 28 30 30 13 3 1 3 7 33 29 29 25 25 6 0 23
23	Maros-C6-SF-07	25 27 29 27 31 34 32 30 32 32 11 5 3 1 5 31 31 31 27 27 4 2 0 24
24	Maros_PN_PF_07	31 29 31 29 33 36 38 36 34 34 9 11 9 7 3 37 33 33 33 33 6 8 6 0 25
25	Maros_PN_SF_07	31 29 31 25 29 28 30 28 26 26 9 7 5 7 7 33 33 33 29 29 2 4 6 8 0 26
26	Nutrisol_C6_06	31 33 35 33 37 40 38 36 38 38 53 47 45 43 47 67 67 71 67 67 48 46 44 50 50 0 27
27	Nutrisol_C6_PF_07	37 39 41 39 43 46 44 42 44 44 55 53 51 49 49 73 73 77 73 73 54 52 50 52 56 6 0 28
28	Nutrisol_C6_SF_07	35 33 35 33 37 40 42 40 38 38 53 51 49 47 47 71 71 67 71 71 48 50 48 46 50 16 18 0 29
29	Nutrisol_PN_PF_07	33 35 37 35 39 42 40 38 40 40 51 49 47 45 45 73 73 73 69 69 50 48 46 48 52 10 4 14 0 30
30	Nutrisol_PN_SF_07	27 29 31 29 33 36 34 32 34 34 49 43 41 39 43 67 67 67 63 63 44 42 40 46 46 8 10 8 6 0 31
31	Reka_C6_06	34 40 38 40 36 28 26 28 30 30 34 36 38 36 40 54 62 58 58 58 35 37 35 41 37 47 53 47 49 43 0 32
32	Reka_C6_PF_07	32 34 32 38 38 34 32 30 32 32 40 34 36 34 38 56 56 52 56 56 37 35 33 35 39 45 51 41 47 41 10 0 33
33	Reka_C6_SF_07	30 32 30 36 36 32 30 28 30 30 38 32 34 32 36 54 54 50 54 54 35 33 31 33 37 47 53 43 49 43 8 2 0 34
34	Reka_PN_PF_07	32 34 32 38 38 34 32 30 32 32 40 34 36 34 38 52 52 52 56 56 37 35 33 35 39 45 51 45 51 45 10 4 2 0 35
35	Reka_PN_SF_07	34 36 34 36 36 32 34 32 30 30 38 36 38 36 36 62 58 58 58 58 35 37 35 33 37 43 49 43 49 43 12 10 8 10 0 36
36	Revancha_C6_06	43 41 43 41 45 42 44 42 40 40 25 23 21 19 19 29 25 25 25 25 18 20 18 16 20 58 64 54 60 54 49 43 41 43 41 0 37
37	Revancha_C6_PF_07	47 45 47 41 45 42 44 42 40 40 25 23 21 23 19 33 29 29 25 25 22 20 22 20 20 58 60 62 56 58 53 51 49 51 49 8 0 38
38	Revancha_C6_SF_07	45 43 45 39 43 40 42 40 38 38 27 21 19 21 21 31 27 27 23 23 20 18 20 22 18 56 62 56 58 52 47 49 47 49 43 6 6 0 39
39	Revancha_PN_PF_07	45 43 45 39 43 40 42 40 38 38 23 21 19 21 17 31 27 27 23 23 20 18 20 18 18 60 62 60 58 56 51 49 47 49 47 6 2 4 0 40
40	Revancha_PN_SF_07	45 43 45 39 43 40 42 40 38 38 23 21 19 21 17 31 27 27 23 23 20 18 20 18 18 60 62 60 58 56 51 49 47 49 47 6 2 4 0 0 41
41	Rojita_C6_06	24 26 28 26 30 24 22 20 22 22 29 23 21 19 23 41 45 41 41 41 22 20 18 24 24 34 40 34 36 30 28 26 24 26 32 34 38 36 36 36 4 0 42
42	Rojita_C6_PF_07	24 26 28 26 30 24 22 20 22 22 29 23 21 19 23 45 45 45 41 41 22 20 18 24 24 30 36 38 36 30 32 30 28 30 32 34 38 36 36 36 4 0 43
43	Rojita_C6_SF_07	24 22 24 22 26 20 18 16 18 18 29 19 17 19 23 45 41 41 37 22 16 18 24 20 34 40 38 36 30 32 30 28 30 32 34 34 32 32 32 4 4 0 44
44	Rojita_PN_PF_07	22 24 26 24 28 22 20 18 20 20 27 21 19 17 21 43 43 43 39 39 20 18 16 22 22 32 38 36 34 28 30 28 26 28 30 32 36 34 34 34 2 2 2 0 45
45	Rojita_PN_SF_07	26 24 26 24 28 22 20 18 20 20 31 21 19 21 25 47 43 43 39 39 24 18 20 26 22 32 38 40 38 32 34 32 30 32 30 36 36 34 34 34 6 2 2 4 0 46
46	Roza_C6_06	4 6 4 2 2 24 26 24 22 22 32 26 28 30 30 52 48 48 44 44 29 27 29 31 27 35 41 35 37 31 38 36 34 36 34 43 43 41 41 41 28 28 24 26 26 0 47
47	Roza_C6_PF_07	6 4 6 4 8 30 28 26 28 38 28 38 28 26 32 50 46 46 42 42 31 25 27 33 29 29 35 33 31 25 36 38 36 36 45 45 39 43 43 26 22 24 24 6 0 48
48	Roza_C6_SF_07	8 2 4 6 10 32 30 28 30 30 40 30 28 30 34 52 44 44 44 44 33 27 29 31 31 31 37 31 33 27 38 36 34 36 34 43 47 41 45 45 28 28 24 26 26 8 2 0 49
49	Roza_PN_PF_07	8 6 8 2 6 28 30 28 26 26 36 30 28 30 30 52 48 48 44 44 33 27 29 31 27 31 37 35 37 31 42 40 38 40 34 43 43 41 41 41 28 24 24 26 22 4 6 8 0 50
50	Roza_PN_SF_07	6 4 6 0 4 26 28 26 24 24 34 28 26 28 28 50 46 46 42 42 27 25 27 29 25 33 39 33 35 29 40 38 36 38 36 41 41 39 39 39 26 26 22 24 24 2 4 6 2 0

Para los casos de distancias mínimas entre variedades, la UPOV aún no ha establecido un valor de referencia; sin embargo, mientras mayor sea la distancia, hay más elementos para proteger los derechos del obtentor y para sustentar la propiedad en caso de plagio.

No obstante, si con miras a garantizar la protección de cada una se exigen distancias demasiado grandes, ello conduciría a un menor estímulo y oportunidad para el desarrollo de los cultivos y pudiera conducir a un monopolio, inhibiendo la liberación de nuevas variedades.

Al respecto, Brs-Alegría y Roza, provenientes de Brasil y Hungría respectivamente, muestran similitud en sus caracteres a través de los ambientes de evaluación; además, las diferencias que se dan dentro y entre variedades, se deben a los caracteres cuantitativos con tipo de observación MS, los cuales son muy similares entre sí, pues las sumas de sus diferencias van de 0 a 10. Cabe mencionar que Roza se encuentra en la base de datos de variedades registradas en la UPOV, mientras que Brs-Alegría no lo está; planteando la posibilidad de que sean una misma, al no haber antecedentes de esta última; por lo anterior, es importante realizar la caracterización de las variedades de interés y registrarlas ante las autoridades correspondientes de cada país; asimismo habrá que realizar evaluaciones en diversos ambientes para tener conocimiento de los posibles cambios que se puedan manifestar en los caracteres que las identifican y distinguen, considerando que muchos caracteres se expresan de acuerdo con las condiciones ambientales que prevalecen en un lugar determinado.

Con base a lo antes expuesto, es recomendable contar con la caracterización de las variedades en su respectivo país de origen y compararla con caracterizaciones que se realizan en otros; ya que, como se ha señalado, las variedades Brs-Alegría y Roza son morfológicamente iguales (Cuadro 1.3) a pesar de provenir de lugares diferentes. Caso contrario ocurre con Maros y Eniko, de cuya comparación se infiere que son muy similares; sin embargo, Maros, al inicio del llenado de grano presenta pigmentación en el opérculo, que es la capa dehiscente que cubre a la semilla, dando esta coloración un aspecto pardo a la inflorescencia en la etapa de madurez, además de que aproximadamente un 10 % de las inflorescencias presentan pigmentación roja de forma heterogénea; llamándose a esta expresión, de manera coloquial, “Payasito” (Figura 1.1); por lo tanto, y para evitar posibles sesgos en la toma de decisiones es necesario complementar la información en el cuestionario técnico que describa totalmente a esa variedad, en el caso de que

existan dudas en la diferenciación, ya que además, en caso de que no se reporten todas las variantes que expresa en los diferentes ambientes, se corre el riesgo de que otra persona la registre con otra denominación.

Otra característica distintiva de Maros, es que presenta pigmentación antocianica en la base del tallo (del 25 al 40 %). Tal como se muestra en la Figura 1.1, Maros y Eniko son muy similares entre sí y posiblemente fueron derivadas de una fuente en común. Al respecto Van Eeuwijk y Law (2004) mencionan que a partir de una variedad, puede suceder que se modifique algún carácter y por lo tanto pasa una prueba de distinción como si fuera nueva, aun cuando no se altera mayormente su estructura genética; denominándose a la “nueva variedad” como esencialmente derivada, lo cual puede probarse utilizando técnicas más finas como los marcadores moleculares.



Figura 1.1. Diferencias en la inflorescencia entre la variedad Maros (A) y Eniko (B).

Esta situación puede darse también a partir de una alta heterogeneidad que incrementa sustancialmente las diferencias entre las accesiones de la misma línea (Romero-Severson *et al.*, 2001, Gethi *et al.*, 2002), proporcionando con ello la posibilidad de declarar a una variedad esencialmente derivada independientemente de la variedad inicial (Heckenberger *et al.*, 2002).

Por otra parte, Nutrisol, Reka y Eniko con sumas de diferencias mayores a 10, acorde a los lineamientos mencionados, pueden considerarse como distintas. Estas diferencias son dadas

por caracteres cuantitativos con tipo de observación MS (medición de varias plantas o partes de plantas individuales) y MG (medición única de un grupo de plantas o partes de plantas), los cuales son influenciados por el ambiente, y trae como consecuencia que la misma variedad pueda tener un comportamiento distinto; derivado de la plasticidad morfológica que presenta el amaranto (Hauptli, 1977; Putnam, 1990). En el Cuadro 1.4 se presentan las calificaciones y sumas de diferencias entre ambientes para Nutrisol, Reka y Eniko considerando 10 caracteres de tipo cuantitativo y cuyas diferencias son mayores a 10. A partir de lo anterior es conveniente que, para evitar posibles errores, se analice en que descriptores se dan tales diferencias antes de considerar a una variedad como estable y diferente.

Cuadro 1.4. Calificaciones y sumas de diferencias en 10 caracteres cuantitativos para tres variedades evaluadas en cinco ambientes: 1(C6-06), 2(C6-PF-07), 3(C6-SF-07), 4(PN-PF-07) y 5(PN-SF-07).

Caracteres/ambientes	Nutrisol						Reka		Eniko	
	1	3	2	3	3	4	1	5	1	3
4. Hoja joven: longitud	7	3	7	3	3	7				
5. Hoja joven: anchura	5	3	7	3	3	7	3	5	7	5
6. Hoja joven: proporción largo/anchura	7	3	7	3	3	5	5	3	3	5
13.Planta: época de aparición de la inflorescencia			7	5	5	7				
14. Época de floración									5	3
28. Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo							7	5	7	3
32. Inflorescencia: longitud	5	3	5	3			3	5		
33. Planta. Época de madurez	5	7					3	5	3	5
34. Planta: longitud										
40. Semilla: peso de 1000 semillas	5	3	5	3	3	5	5	3		
Suma de diferencias:	16		18		14		12		12	

Asimismo se fortalece la necesidad de que deben caracterizarse las variedades en dos años consecutivos en ciclos de crecimiento similares; toda vez que para Nutrisol hay una diferencia de 18, 16 y 14 unidades entre ambientes y años de evaluación, debido a que en C6-06 hubo mayor desarrollo en HJL, HJA, HJPLA, IL, PEM y PMS; con respecto a los ambientes C6-SF-07. Un comportamiento similar ocurrió con respecto a C6-PF-07 y C6-SF-07 adicionando diferencias en EF e IL para un total de 16; mostró también una suma de diferencias de 14 en los ambientes C6-SF-07 y PN-PF-07; siendo notables las diferencias en comportamiento, muy

marcadas con respecto a ambientes y fechas de siembra, mostrando menor desarrollo en las siembras realizadas en el mes de julio. Al respecto cabe señalar que *A. hypochondriacus* es sensible al fotoperiodo, razón por la cual se tienen modificaciones inclusive morfológicas en las variedades de esta especie; caso contrario sucede con *A. cruentus*.

En Reka se obtuvo una población menor a 20 plantas por parcela; posiblemente, por ser de doble propósito, y que como tal requiere de un manejo ornamental como el sombreado y una desinfestación del terreno de siembra; no obstante, es de mencionar que aun con los problemas que presentó para adaptarse en nuestro país, siempre conservó sus caracteres y se pudo diferenciar perfectamente del resto de variedades; además, en las siembras realizadas en 2008 se obtuvo una población mayor a 20 plantas con buen aspecto en sanidad y muy vigorosas, que lograron llegar a madurez fisiológica sin verse afectadas por algún factor adverso.

Eniko presentó menor desarrollo para el carácter HJPLA y menor tiempo en PEM; particularmente cuando las siembras se realizaron en el mes de mayo; caso contrario ocurrió con Nutrisol, ya que su madurez fue precoz al sembrar en el mes de junio, con 146 días; mientras que al sembrarse en mayo, su ciclo fue más tardío, con 165 días; al respecto, el National Research Council (1984) menciona que muchos amarantos son sensibles a la longitud del día; así *A. hypochondriacus* requiere de días cortos para poder alcanzar la madurez, en tanto *A. cruentus*, que proviene de Nigeria, forma muy rápido las semillas cuando se establece en condiciones de días muy largos; siendo este el caso de Reka y Eniko que se comportaron como de esta especie, pero están clasificados como *A. caudatus*; que es reconocida como de días cortos, ya que usualmente florece y forma semillas únicamente cuando la longitud del día es menor a ocho horas. Finalmente, en los caracteres HJA, EF e INFFXG se presentó una mayor proporción en la siembra realizada en C6-06.

Con base a lo anterior, y para el caso de variedades de amaranto, es necesario ampliar el número de unidades que las diferencian, pues de otra manera se podría cometer el error de decir que una misma variedad es diferente de acuerdo al SISNAVA cuando en realidad no lo es. La otra cuestión es que la caracterización se debe realizar en el ambiente para el cual se recomienda, pues hay respuestas muy diferentes entre especies al cambiarlas de ambiente.

Considerando que con la aplicación del SISNAVA se encontraron sumas de hasta 18 unidades de diferencias entre las caracterizaciones para una misma variedad; se propone ampliar a 20 el límite que obligue a evaluaciones adicionales para decidir que una variedad candidata de amaranto es distinta de las ya registradas.

El comportamiento anterior se debe a efectos ambientales que afectan tanto a caracteres cuantitativos como cualitativos. En el caso de estos últimos deben considerarse aquellos factores que puedan afectar tanto la expresión presencia *vs* ausencia como la gama de variación en los niveles de expresión cuando están presentes; tal es el caso de las antocianinas que son afectadas en la intensidad de su color por las temperaturas y son favorecidas por la luminosidad (Kliewer y Torres, 1972) de aquí, que a los caracteres relacionados con el color y su grado de variación se les asignen notas 3, 5 y 7, a fin de obtener una distribución equilibrada en la gama de expresión; además de que es más fácil identificar los niveles de acuerdo a la gama estándar (3, 5, 7 y 9) de la escala 1 a 9 (UPOV, 2004a); se debe considerar asimismo, que la calificación del carácter también depende en gran medida de la parte de la planta en que se realice dicha calificación, siendo que la mayor concentración de antocianinas se encuentra en las hojas apicales en comparación con las hojas medias y basales; debiendo tener en cuenta, adicionalmente, que las concentraciones se incrementan en la madurez (Khandaker *et al.*, 2009); además de que los pigmentos son traslocables, por lo que la coloración de tejidos cambia con la maduración.

Para el análisis de varianza general se usaron sólo los caracteres HJL, HJA, HJPLA, EAI, INFFXG, IL, PL y PMS, pues para otorgar una nota numérica de acuerdo a la guía para la descripción varietal de amaranto (UPOV, 2008a), se consideró el tipo de observación MS, MG y VS, además de que todos ellos son QN; por lo tanto, se tomaron datos de manera individual. Por lo anterior, en el Cuadro 1.5 se detectaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0.05$) en los genotipos, ambientes y en la interacción $G \times A$, con excepción del carácter IL para $G \times A$, lo cual indica que las variedades son estables para este carácter. El carácter PMS no presentó significancia para el factor ambiente, lo que en principio se debe, a que el cultivo del amaranto presenta plasticidad morfológica (Hauptli, 1977; Putnam, 1990); condición que se debe de considerar al solicitar un registro de protección al derecho de obtentor para la especie

Amaranthus ya que si las variedades registradas dejan de presentar alguno de los requisitos de protección (DHE), se puede cancelar o anular el registro otorgado.

Cuadro 1.5. Cuadrados medios del análisis de varianza de 10 variedades de amaranto y coeficientes de variación.

Variab	Genotipo (G)	Ambiente (A)	G x A	Error	CV (%)
HJL	31.86**	405.49**	11.97**	1.40	14.11
HJA	19.57**	173.90**	3.96**	0.59	15.46
HJPLA	0.92**	1.01**	0.14**	0.04	12.75
EAI	6237.91**	396.91**	219.45**	0.00077	0.15
NFFXG	126726.73**	70433.83**	16111.84**	1139.85	37.41
IL	1515.72**	235.23**	3706.44	173.46	25.33
PL	100600.37**	1906.32	4425.22**	528.37	16.52
PMS	0.26**	0.03	0.12**	0.01	19.16

1.5.2.2. Análisis COYD

El análisis COYD muestra que una misma variedad se comporta diferente en sus caracteres cuantitativos si se evalúa en diversos ambientes, de aquí la importancia de que el obtentor deba conocer sus variedades a registrar, y que los caracteres evaluados sean claros y consistentes (UPOV, 2002).

En el Cuadro 1.6 se observa que cada una de las variedades mostraron distinción en por lo menos tres ambientes para los caracteres HJL y HJA; Rojita resultó ser según la DMS (1.44) en C6-TF-07 (6.1 cm) y PN-TF-07 (3.9 cm) en relación con los demás ambientes de evaluación, siendo el máximo valor 8.9 cm en C6-06 para el carácter HJL. Este comportamiento fue similar para el carácter HJA al igual que ocurrió para las variedades Nutrisol, Revancha, Edit y Maros; mientras que Roza sólo mostró distinción con respecto a C6-06 y C6-TF-07, y Eniko en C6-PF-07 con C6-TF-07; mientras que para el carácter HJPLA las variedades que no mostraron diferencias fueron Rojita, Nutrisol, Roza, Edit, Reka, Brs-Alegría y Mariel, pero no coinciden totalmente las calificaciones que se otorgan a cada carácter de acuerdo a la guía para la descripción varietal de amaranto, aunque cabe mencionar que estas se asignan con base en la

distribución acumulada al realizar un muestreo en campo. Los caracteres que muestran distinción en una misma variedad son los de tipo de observación MS.

Cuadro 1.6. Análisis Combinado Interanual de Distinción (COYD) en los ambientes de evaluación.

Variedad/ ambiente	Hoja Joven: Longitud (cm)							DMS $p=0.01$
	1 [†]	2	3	4	5	6	7	
Rojita	8.9 (5)	8.7 (5)	8.7 (5)	6.7 (5)	8.6 (5)	6.1 (3)	3.9 (3)	1.44
Nutrisol	10.8 (7)	10.9 (7)	11.5 (7)	7.5 (3)	9.8 (5)	7.5 (3)	4.7 (3)	1.34
Revancha	9.4 (5)	10 (5)	10 (5)	9.4 (5)	9.9 (5)	7.5 (3)	3.9 (3)	1.67
Roza	9.4 (5)	9.1 (5)	8 (5)	9.2 (5)	8.1 (5)	7.6 (5)		1.67
Reka	8.1 (5)	8.7 (5)	8.7 (5)	9.0 (5)	9.1 (5)	6.5 (3)	4.2 (3)	1.23
Edit	8 (5)	8.9 (5)	8.6 (5)	8.9 (5)	8.5 (5)	6.4 (3)	3.8 (3)	1.49
Maros	8.4 (5)	9.7 (5)	10 (5)	9.4 (5)	8.6 (5)	6.5 (5)	7.8 (5)	1.5
Eniko	8.6 (5)	9.3 (5)	9.1 (3)	9.1 (5)	8.5 (5)	7.7 (5)		1.51
Brs-Alegría	9.1 (5)	8.9 (5)	8.8 (5)	8.6 (5)	8 (5)	6.6 (3)		2
Mariel	7.5 (3)	10.4 (5)	9.3 (5)	7.9 (5)	9 (5)	7.6 (5)		1.74

Variedad/ ambiente	Hoja Joven: Anchura (cm)							DMS $p=0.01$
	1	2	3	4	5	6	7	
Rojita	5(3)	5 (3)	5.1 (5)	5.1 (5)	5.1 (5)	3.4 (3)	2.1 (3)	0.85
Nutrisol	5.8 (5)	6.2 (7)	6.4 (7)	5 (3)	5.5 (5)	4.1 (3)	2.6 (3)	1.25
Revancha	6 (5)	6.8 (7)	4.1 (3)	5.8 (5)	6.4 (7)	4.1 (3)	2.1 (3)	0.96
Roza	5.9 (5)	5.5 (5)	5.1 (3)	5.5 (5)	5.1 (5)	4.5 (3)		0.97
Reka	4.5 (3)	4.8 (3)	4.7 (3)	5.5 (5)	5.6 (5)	3.4 (3)	2.1 (3)	1.0
Edit	5.3 (5)	5.2 (5)	5.4 (5)	5.1 (5)	5.4 (5)	3.5 (3)		0.92
Maros	5.5 (5)	5.8 (5)	6.4 (7)	5.3 (5)	5.8 (5)	3.9 (3)	4.6 (3)	1.06
Eniko	6.1 (7)	5.7 (5)	5.4 (5)	5.2 (5)	6.2 (7)	4.7 (3)		1.22
Brs-Alegría	5.4 (5)	5.2 (5)	5.4 (5)	5 (3)	5 (3)	3.9 (3)		1.38
Mariel	4.1 (3)	5.4 (5)	5.4 (5)	4.4 (3)	5.2 (5)	4 (3)		1.18

Variedad/ ambiente	Hoja Joven: Proporción largo/ancho (cm)							DMS $p=0.01$
	1	2	3	4	5	6	7	
Rojita	1.8 (5)	1.7 (5)	1.7 (5)	1.7 (5)	1.6 (3)	1.7 (5)	1.9 (3)	0.25
Nutrisol	1.9 (7)	1.9 (7)	1.8 (5)	1.5 (5)	1.8 (5)	1.8 (5)	1.8 (5)	0.42
Revancha	1.5 (3)	1.5 (3)	1.5 (3)	1.6 (3)	1.5 (3)	1.8 (5)	1.8 (5)	0.26
Roza	1.6 (3)	1.7 (5)	1.6 (3)	1.7 (5)	1.6 (3)	1.7 (5)		0.97
Reka	1.8 (5)	1.8 (5)	1.9 (7)	1.6 (3)	1.6 (3)	1.8 (5)	1.9 (7)	0.34
Edit	1.5 (3)	1.7 (5)	1.6 (3)	1.8 (5)	1.6 (3)	1.8 (5)	1.7 (5)	0.3
Maros	1.5 (3)	1.7 (5)	1.5 (3)	1.8 (4)	1.4 (3)	1.6 (3)	1.7 (5)	0.25
Eniko	1.5 (3)	1.7 (5)	1.7 (5)	1.8 (5)	1.4 (3)	1.6 (3)		0.35
Brs-Alegría	1.7 (5)	1.7 (5)	1.6 (3)	1.6 (3)	1.5 (3)	1.6 (3)		0.33
Mariel	1.9 (7)	1.9 (7)	1.7 (5)	1.8 (5)	1.8 (5)	1.9 (7)		0.32

Cuadro 1.6. Continuación...

Variedad/ ambiente	Número de flores femeninas por glomérulo							DMS P=0.01
	1	2	3	4	5	6	7	
Rojita	74 (3)	36 (3)	38 (3)	64 (3)	84 (3)			34.94
Nutrisol	55 (3)	30 (3)	21 (3)	79 (3)	20 (3)			52.63
Revancha	111 (5)	64 (3)	66 (3)	77 (3)	80 (3)			47.46
Roza	137 (5)	95 (3)	93 (3)	91 (3)	91 (3)			51.45
Reka	196 (7)	101 (5)	130 (5)	108 (5)	124 (5)			66.49
Edit	258 (7)	160 (7)	140 (5)	108 (5)	146 (5)			76.42
Maros	59 (3)	96 (3)	47 (3)	89 (3)	64 (3)			38.06
Eniko	203 (7)	115 (5)	66 (3)	71 (3)	73 (3)			62.66
Brs-Alegría	86 (3)	86 (3)	74 (3)	109 (5)	189 (7)			81.33
Mariel	60 (3)	58 (3)	49 (3)	46 (3)	59 (3)			19.24

Variedad/ ambiente	Longitud de inflorescencia (cm)							DMS P=0.01
	1	2	3	4	5	6	7	
Rojita	56 (3)	74 (5)	54 (3)	58 (3)	65 (5)			25.3
Nutrisol	75 (5)	67 (5)	59 (3)	54 (3)	57 (3)			27.2
Revancha	46 (3)	52 (3)	44 (3)	55 (3)	45 (3)			17.8
Roza	50 (3)	56 (3)	67 (5)	51 (3)	49 (3)			18.5
Reka	60 (3)	34 (3)	46 (3)	51 (3)	63 (5)			38.0
Edit	47 (3)	38 (3)	36 (3)	71 (5)	36 (3)			18.1
Maros	48 (3)	51 (3)	51 (3)	52 (5)	53(3)			15.6
Eniko	50 (3)	51 (3)	46 (3)	49 (3)	51(3)			19.4
Brs-Alegría	50 (3)	50 (3)	51 (3)	49 (3)	45(3)			16.81
Mariel	35 (3)	54 (3)	55 (3)	40 (3)	35 (3)			19.43

Variedad/ ambiente	Altura de planta (cm)							DMS P= 0.01
	1	2	3	4	5	6	7	
Rojita	129 (3)	158 (5)	145 (3)	142 (3)	147 (3)			38.12
Nutrisol	228 (5)	219 (5)	203 (5)	182 (5)	197 (5)			58.79
Revancha	132 (3)	148 (3)	113 (3)	152 (5)	143 (3)			33.27
Roza ^{†††}	130 (3)	175 (5)	137 (3)	161 (5)	144 (3)			25.5
Reka ^{†††}	154 (5)	101 (3)	146 (3)	129 (3)	160 (5)			70.14
Edit	86 (3)	70.3 (3)	69 (3)	75 (3)	70 (3)			30.24
Maros	117 (3)	133 (3)	141 (5)	141 (5)	136 (3)			24.46
Eniko	122 (3)	141 (3)	133 (3)	136 (3)	138 (5)			31.35
Brs-Alegría	142 (3)	148 (3)	151 (5)	145 (3)	138 (3)			26.78
Mariel	113 (3)	134 (3)	139 (3)	150 (3)	103 (3)			28.62

†: 1(C6-06), 2(C6-PF-07), 3(PN-PF-07), 4(C6-SF-07), 5(PN-SF-07), 6(C6-TF-07) y 7 (PN-TF-07).

††: El número entre paréntesis corresponde a la calificación de acuerdo a la Guía para la Descripción Varietal de amaranto (UPOV, 2008a).

†††: Los números en negrita muestran, como ejemplo, que no se cumple con la escala relativa debido a efectos del ambiente y de interacción genotipo x ambiente.

En cuanto al INFFXG, las variedades que no mostraron distinción entre ambientes fueron Revancha con una amplitud de 111 a 64 flores por glómulo y una DMS de 47.46, y Roza con 1367-91 y una DMS de 51.45; en tanto Mariel fue más homogénea en el número de flores con valores de 60 a 46 y una DMS de 19.24. En este carácter, los resultados dependen mucho de la época en que se realice el conteo y la parte de la inflorescencia de donde se tomen los glómulos para su cuantificación.

Para el carácter IL, las variedades que mostraron distinción en los ambientes de evaluación, fueron Roza, Edit y Mariel. Edit fue la que presentó menor homogeneidad.

Para el carácter AP, la variedad más heterogénea fue Roza ya que mostró variación en cuatro ambientes, seguida de la variedad Mariel que presentó una AP de 103-150 cm en C6-SF-07 y PN-SF-07 y Revancha con una magnitud de 113 a 152 cm en PN-PF-07 y PN-SF-07. El resto de las variedades no mostró distinción para este tipo de análisis.

Cabe señalar que el SISNAVA es aceptable, dado que en éste se incluyen todos los caracteres, a los cuales se les otorga una nota, por lo cual detecta poca variación entre un mismo carácter QN; sin embargo, y como se observa en la Cuadro 1.3, las diferencias encontradas para la misma variedad en distintos ambientes pueden deberse a este tipo de caracteres.

Típicamente, las características tomadas en campo para las pruebas DHE se basan en observaciones morfológicas, tales como el color de la hoja, el tipo de margen, y el color de la inflorescencia, que son caracteres típicos y son además una mezcla de descriptores que se expresan de forma continua o discontinua y que aun al analizarlos estadísticamente, el obtentor debe tomar la decisión en cuanto a si son o no distintos en una misma variedad.

Al comparar el Análisis COYD y el SISNAVA utilizado en nuestro país, se observan las virtudes y aceptación de cada uno; siendo que el COYD aunque muestre distinción en una misma variedad, se sabe que los caracteres QN utilizados en éste son influenciados por el ambiente, y que en realidad hay caracteres de más importancia para lograr distinguir una variedad de otra; sin embargo, el análisis COYD proporciona información de los valores máximos y mínimos en que estos caracteres pueden variar, así como las fechas límites para el establecimiento de siembras con fines de caracterización.

La UPOV (2004a) menciona con respecto a las variedades de referencia, que “la razón principal para utilizarlas en lugar de mediciones, es que éstas pueden sufrir la influencia del ambiente; se supone entonces, que pueden variar de forma proporcional a través de ambientes de prueba y mantener la misma escala de calificación”; sin embargo, para el caso específico de Roza y Reka en el carácter PL no muestran este comportamiento en C6-06 y C6-PF-07, ya que Roza tuvo calificaciones de 3 y 5, mientras que Reka se comportó de manera inversa con calificaciones de 5 y 3. Por lo anterior, y para el caso del cultivo de amaranto, se debe aceptar que las variedades no siempre presentan un comportamiento estable con respecto a los caracteres cuantitativos, y además considerar que este cultivo presenta una gran plasticidad, por lo que se debe tener precaución con las variedades de referencia que se vayan a elegir para éste propósito, ante la incertidumbre del comportamiento de las variedades candidatas a la protección.

1.5.2.3. Análisis de conglomerados

Los análisis de conglomerados para agrupar variedades con base en sus caracteres se muestran en las Figuras 1.2 a 1.6, en las que se logra apreciar el grado de distinción de cada una en relación con las demás, así como la similitud entre ellas; las variedades más parecidas fueron Brs-Alegría y Roza, las cuales comparten 35 caracteres, entre ellos 12 esenciales (*); seguidas de Maros y Eniko, con 36 de entre los cuales 11 son esenciales (*); aunque Maros presentó características distintivas que no están incluidas en la guía, tales como Inflorescencia: color variegado e Inflorescencia: pigmentación en la base del utrículo, carácter que le da un aspecto de color pardo a la estructura reproductiva. Los caracteres mencionados se presentaron desde la etapa de floración hasta la madurez fisiológica, y hasta entonces, Maros y Eniko son muy semejantes en sus caracteres morfológicos. La variedad que expresa mayor distinción es Mariel, pues muestra características como el color de la inflorescencia, del tallo, del peciolo y las semillas, que son de color amarillo.

En las Figuras 1.2 y 1.3 se observa la formación de dos grupos principales. Las variedades: Rojita, Edit, Reka, Nutrisol, Roza y Brs-Alegría forman el primer grupo, con similitudes en cuatro caracteres esenciales (*): 1:CPA, 2:PPAH, 20:LPM y 35:TPAB; mientras que Revancha, Maros, Eniko y Mariel forman el segundo, presentaron cuatro caracteres con la misma calificación: 17:PPA, 20:LPM, 27:IT y 35:TPAB.

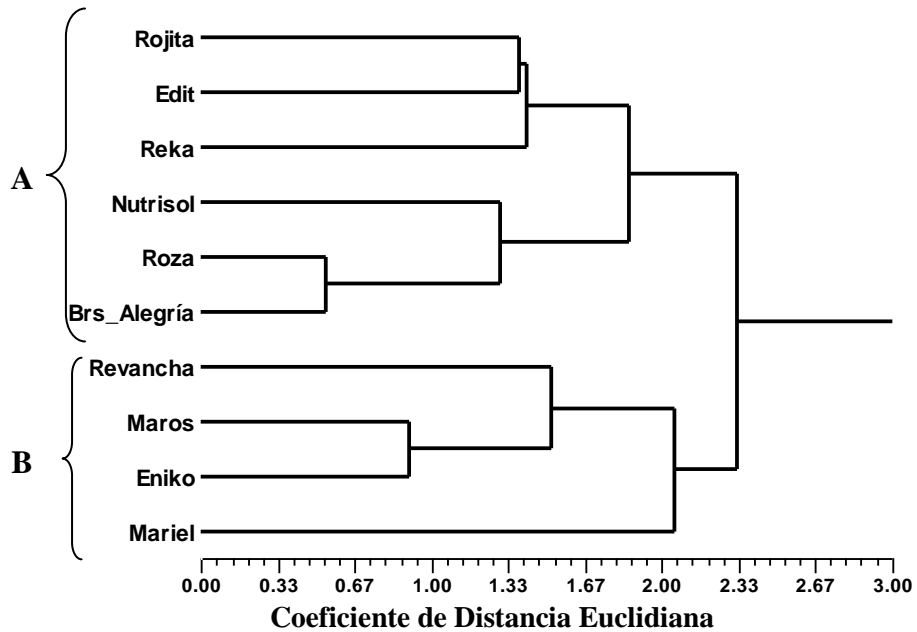


Figura 1.2. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote C6-06 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.

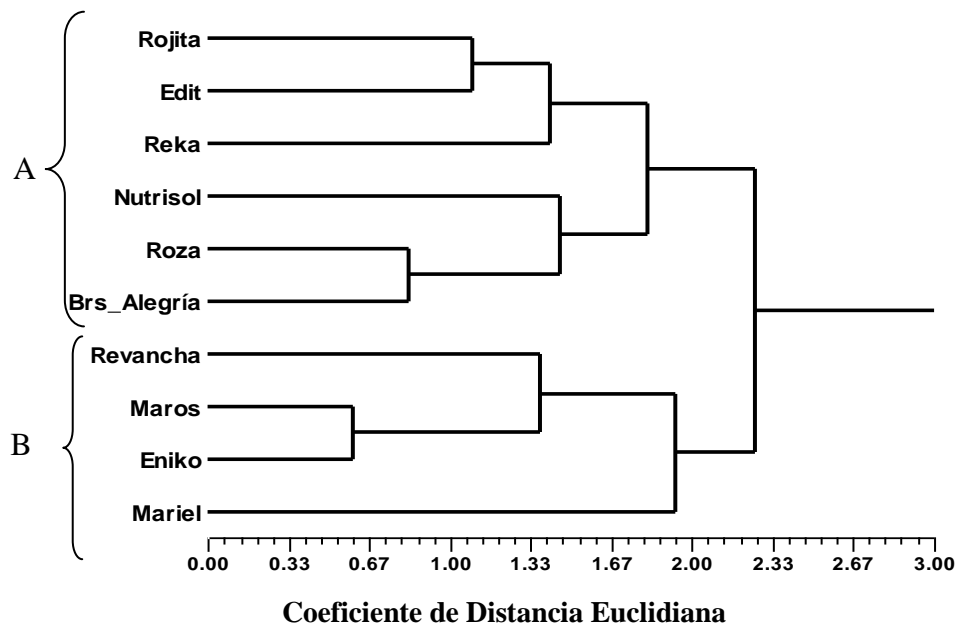


Figura 1.3. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote PN-SF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.

En las Figuras 1.4 a 1.6 se aprecia que se formaron dos grupos principales (A y B) y a la vez, el primer grupo se subdivide en tres: A.1: Rojita Edit y Reka, las cuales comparten en promedio 20 caracteres, y entre estos, se encuentran seis esenciales CPA, PPAH, PPA, LPM, TPAB, SF; A.2: Revancha, Maros y Eniko que presentaron similitudes en ocho caracteres esenciales: PPAH, PPA, LPM, IC, IT, TPAB y SC; y A.3: Nutrisol, Brs-Alegría y Roza, que también presentan similitudes en el mismo número de caracteres esenciales: CPA, PPAH, PPA, LPM, IT, TPAB, TFST y SC; Mariel formó por si sola un grupo (B), siendo distinta en la mayoría de los caracteres, principalmente en IC, lo que la hace diferente de todas las variedades registradas de amaranto. Las variedades que presentaron mayor proximidad, fueron Rojita y Edit, Roza y Brs-Alegría, Maros y Eniko.

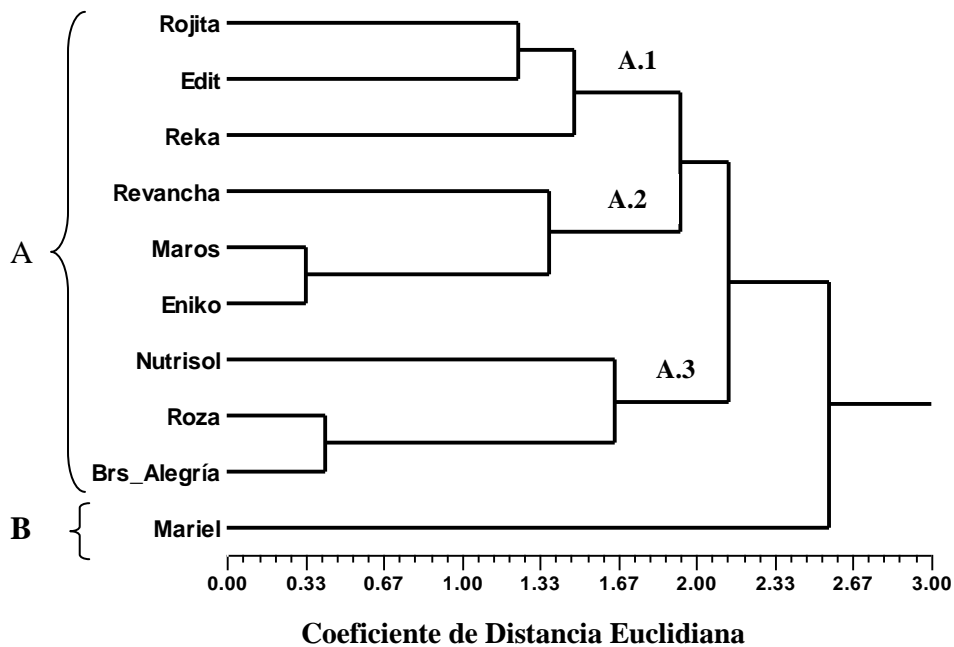


Figura 1.4. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote C6-PF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.

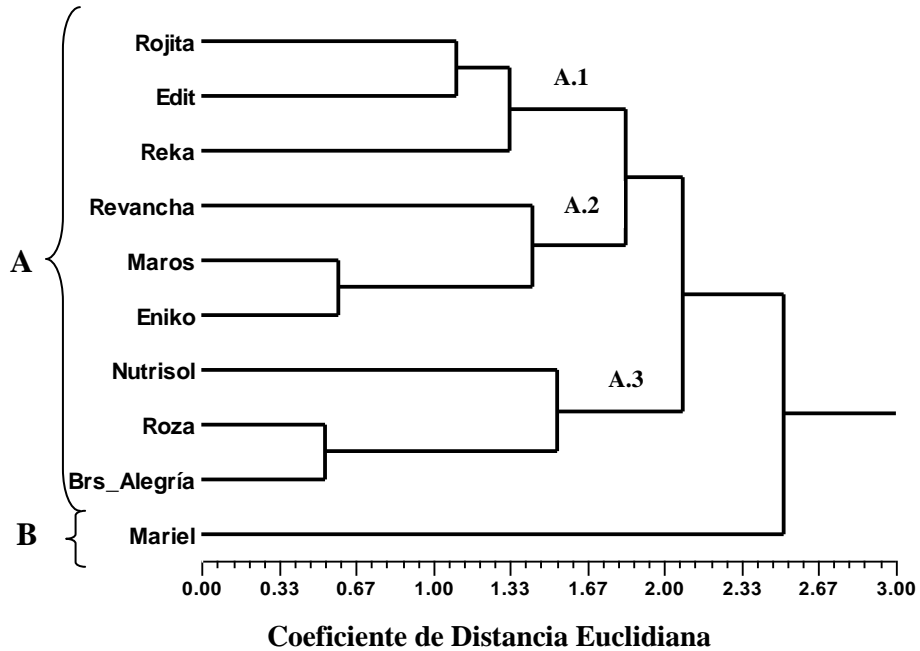


Figura 1.5. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el Lote PN-PF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.

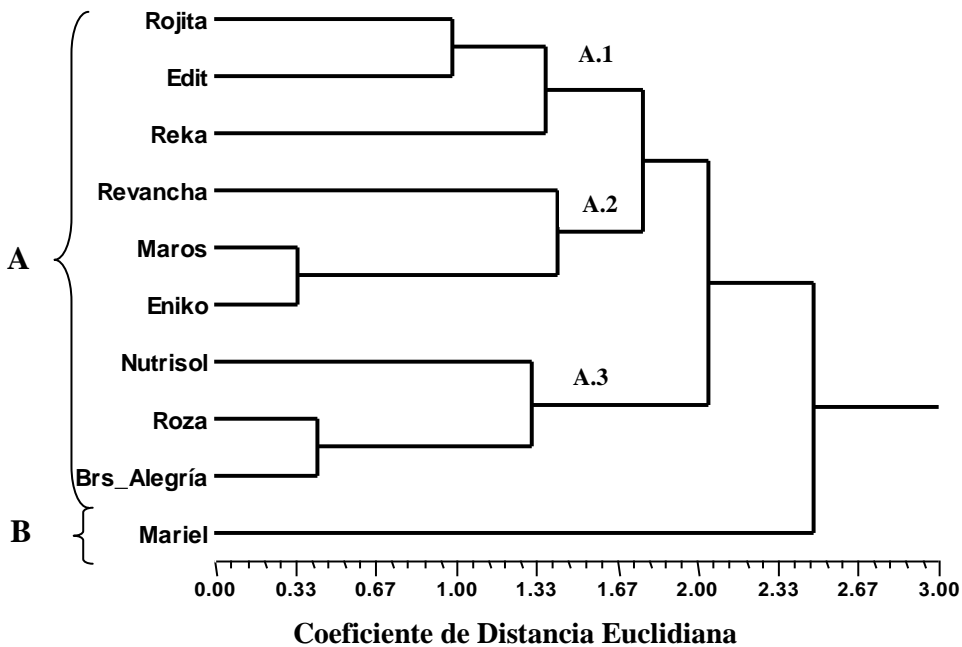


Figura 1.6. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas en el C6-SF-07 agrupadas con el método UPGMA utilizando la distancia Euclidiana.

1.5.2.4 Análisis de componentes principales

Para la realización del presente análisis no se consideraron los siguientes caracteres: Tallo: color de las rayas (TCR), Limbo: color principal (LCP), Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM), Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR), Limbo: color de la mancha (LCM) y Limbo: forma de la mancha (LFM); debido a que no todas las variedades presentan los dos primeros caracteres y en el caso de tres últimos ninguna de las variedades evaluadas presenta mancha en la hoja.

Por otra parte, el programa no consideró los caracteres Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA), Plántula: pigmentación antociánica del hipocótilo (PPAH), Hoja joven: longitud (HJL), Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN), Hoja joven: color del envés (HJCE), Tallo: color (TC) y Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB), dado que los niveles de calificación en la mayoría de las variedades son iguales.

Por lo anterior, el análisis de componentes principales se realizó con sólo 27 caracteres. Los valores propios, y el porcentaje de la varianza explicada para cada componente principal se presentan en el Cuadro 1.7.

Se muestra que la varianza asociada a cada uno de los componentes principales es diferente y que decrece en orden de magnitud; así el primer componente principal concentra el 36.71% de la variabilidad total; el segundo componente principal, el 27.93 %, el tercer componente el 13.05% y el cuarto sólo incrementa el 5.61% de la variabilidad total. Los primeros cuatro componentes concentran el 83.30%; donde el uno y el dos reúnen el 64.65% de la variabilidad total existente entre las variedades analizadas; este proceso se da sucesivamente, hasta que toda la variabilidad queda distribuida diferencialmente entre los 27 componentes.

La selección en el número de componentes principales que se deben considerar para un análisis aún es tema de discusión ya que no existen pruebas estadísticas de inferencia que permitan probar el significado de dichos valores. La selección no depende del número de componentes obtenidos, ya que los análisis generan tantos componentes como variables en el estudio (Rojas, 2003).

Cuadro 1.7. Valores propios y porcentaje de la variabilidad que aportan los componentes principales, generados con caracteres de la guía para la descripción varietal de amaranto.

Componente Principal	Vapor propio	Diferencia	Varianza explicada	Varianza acumulada
1	9.912	2.371	0.367	0.367
2	7.541	4.018	0.279	0.646
3	3.523	2.009	0.130	0.776
4	1.514	0.389	0.056	0.833
5	1.124	0.295	0.041	0.874
6	0.829	0.154	0.030	0.905
7	0.674	0.082	0.025	0.930
8	0.592	0.150	0.021	0.952
9	0.441	0.097	0.016	0.968
10	0.343	0.057	0.012	0.981
11	0.286	0.121	0.010	0.992
12	0.164	0.114	0.006	0.998
13	0.050	0.050	0.001	1.000
14	0.000	0.000	0.000	1.000
.
.
.
27	0.000	0.000	0.000	1.000

Las variables más importantes para cada componente principal fueron determinadas con base en los coeficientes de los vectores propios de cada uno, considerándose como importantes aquellas con los coeficientes con valores absolutos más altos. En el Cuadro 1.8 se pueden observar las aportaciones de cada una a los componentes principales. El primer componente principal estuvo influenciado mayormente por 11 variables: PICAH, HJPPMA, HM, PEAI, EF, IC, IT, ILBRU, IP, SC y SF; el segundo por HPLA, LCP, IDG, ST y SPMS; el tercer componente por el carácter INFFXG, mientras que en el cuarto influyeron principalmente los caracteres AH, IL, PEM y PL.

Al observar los datos del Cuadro 1.8 y comparando éstos en la tabla de caracteres, el ACP sólo considera 27, e indica que 21 son los que explican en mayor proporción (83.30 %) el total de la variación, indicando que con ellos es factible realizar la caracterización en variedades de *Amaranthus*; no obstante, en este grupo de 21 caracteres, no se incluyen en su totalidad los caracteres esenciales (*), los cuales son fundamentales para la armonización de las pruebas a

nivel internacional; al respecto, en el primer componente influyen mayormente cinco y en el segundo solamente uno; cinco no son analizados por el ACP por ser constantes o por poseer datos incompletos, y los tres restantes no son considerados trascendentes dentro de los cuatro componentes principales.

Cuadro 1.8 Vectores propios de los primeros cuatro componentes principales en 10 variedades de amaranto.

Carácter	Abreviatura	C.P.1	C.P. 2	C.P. 3	C.P. 4
3	PICAH	0.085	-0.167	0.442	0.023
5	HJA	-0.203	-0.079	0.073	0.440
6	HJPLA	0.071	0.181	-0.165	-0.327
7	HJPPMA	0.146	-0.318	0.051	-0.037
9	HJCPH	-0.315	-0.020	-0.005	-0.057
10	HJDSCH	-0.172	-0.299	0.039	-0.087
12	HM	0.315	0.020	0.005	0.057
13	PEAI	0.149	0.011	-0.011	-0.313
14	EF	0.199	0.117	-0.160	-0.081
17	PPA*	-0.110	-0.335	0.046	-0.084
19	LCP	-0.258	0.127	0.235	0.008
24	IC*	0.268	0.132	0.195	0.092
25	ICOM	-0.272	-0.104	0.215	-0.045
26	IDG	-0.094	0.222	0.378	0.069
27	IT*	0.180	0.198	0.314	0.103
28	INFFXG	0.068	0.091	0.356	-.167
29	ILBRU*	0.110	0.335	-0.046	0.084
30	HC*	-0.146	0.318	-0.051	0.037
31	IP	0.264	-0.197	0.036	0.005
32	IL	-0.012	0.064	-0.133	0.571
33	PEM	0.037	-0.250	-0.286	0.100
34	PL	0.064	-0.086	-0.082	0.372
36	TFST*	-0.315	-0.020	-0.005	-.057
37	SC*	0.315	0.020	0.005	0.057
38	SF*	0.107	-0.162	0.337	0.084
39	ST*	-0.146	0.318	-0.051	0.037
40	SPMS	-0.146	0.126	-0.003	-.127

*: Caracteres esenciales; Números en negrita indican los caracteres asociados al primer, segundo, tercer y cuarto componente principal.

El análisis mediante el programa Minitab muestra la separación de las variedades de acuerdo con los caracteres que las definen (Figuras 1.7 y 1.8). Se aprecia una agrupación similar a la que se muestra en las Figuras 1.2 a 1.6, donde Revancha, Maros y Eniko forman un grupo;

sin embargo, las tres se distinguen plenamente entre sí; en este mismo sentido Rojita y Edit tienen cierta similitud mientras que Nutrisol, Reka y Mariel se mantienen de manera individual.

En la Figura 1.7 se puede observar que las variedades de amaranto presentaron mucha plasticidad; es decir, sus caracteres pueden modificar su expresión en respuesta a las condiciones distintas del ambiente; en este aspecto, es importante tener en cuenta que uno de los requisitos para la protección y derechos del obtentor es que la variedad en cuestión deba cumplir con el examen DHE, y que si ésta llegase a perder uno de estos criterios, se puede declarar la caducidad de la protección y el derecho del obtentor (UPOV, 2010).

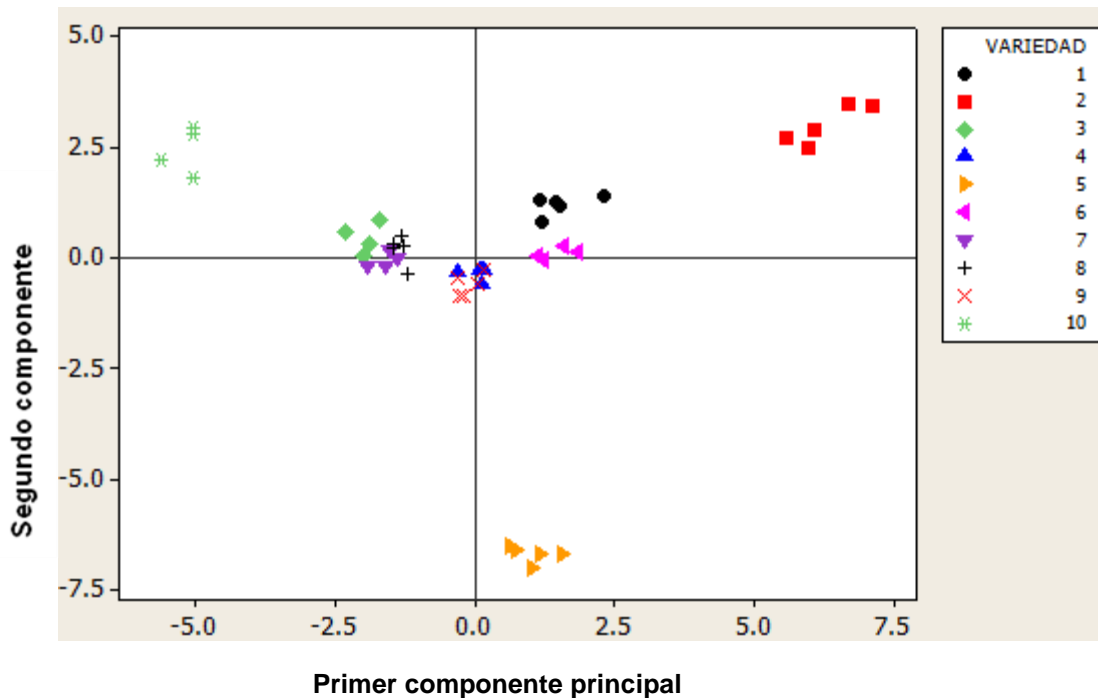
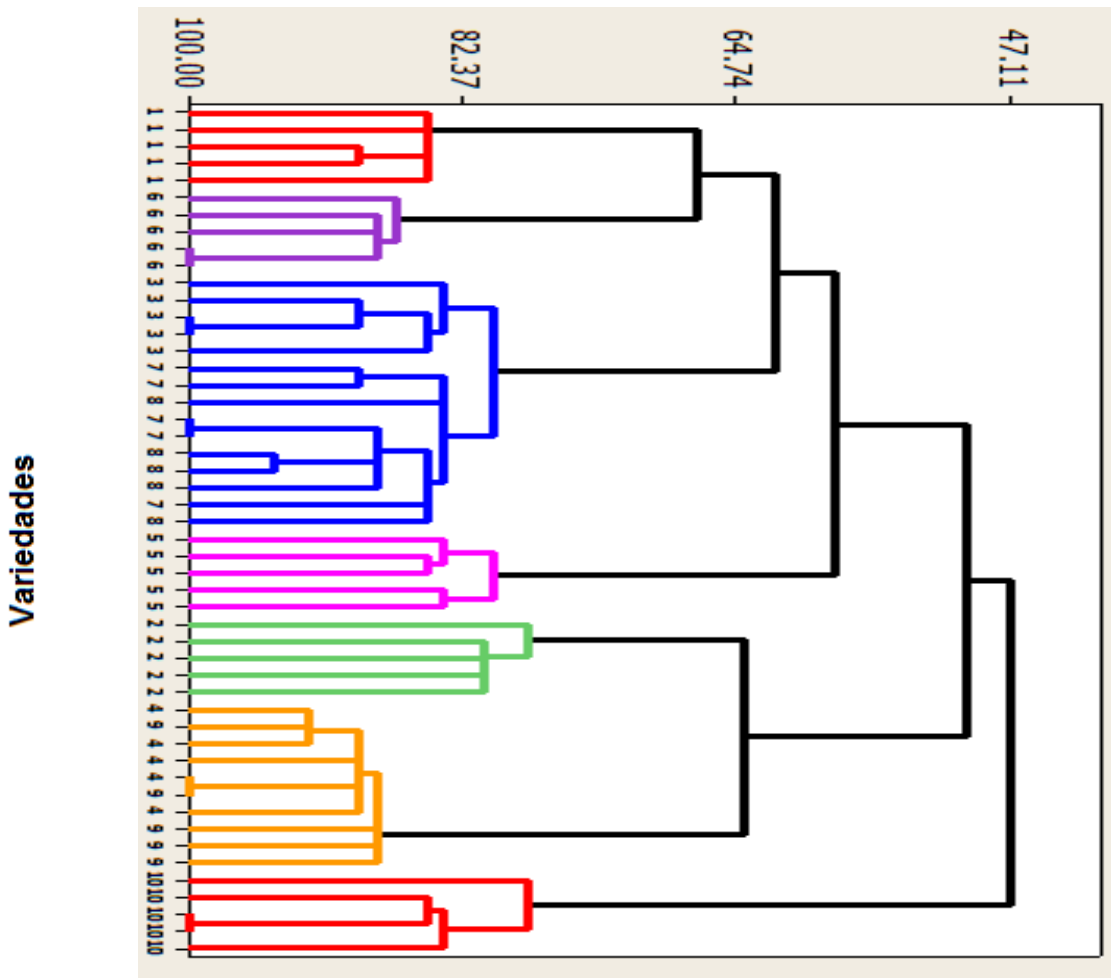


Figura 1.7. Distribución de 10 variedades de amaranto sobre el plano cartesiano de los dos primeros componentes principales (1: Rojita, 2: Nutrisol, 3: Revancha, 4: Roza, 5: Reka, 6: Edit, 7: Maros, 8: Eniko, 9: Brs-Alegría, 10: Mariel).

No obstante, lo anterior aplica cuando los caracteres pertinentes son los que dejan de cumplir uno de los criterios; en este caso los caracteres QN son los que interactúan y se expresan de acuerdo al ambiente de evaluación, tal como se muestra en la Figura 1.9, donde se aprecia que estos son homogéneos pero no estables en términos de los niveles de expresión en caracteres

descriptivos; sin embargo, los caracteres QL y PQ ayudan a definir plenamente a cada una de las diez variedades caracterizadas.

Asimismo, en la Figura 1.8 se aprecia de una mejor manera el agrupamiento de las variedades, pudiendo utilizarse de manera complementaria al Cuadro 1.3, pues Revancha, Maros y Eniko expresan caracteres muy similares entre sí, al igual que con Roza y Brs-Alegría.



Distancia euclidiana y unidades sin estandarizar con un nivel de similitud del 70%

Figura 1.8. Análisis de conglomerados con distancia de vinculación individual utilizando la distancia euclidiana por el método de agrupamiento UPGMA en 10 variedades de amaranto. 1: Rojita, 2: Nutrisol, 3: Revancha, 4: Roza, 5: Reka, 6: Edit, 7: Maros, 8: Eniko, 9: Brs-Alegría, 10: Mariel.

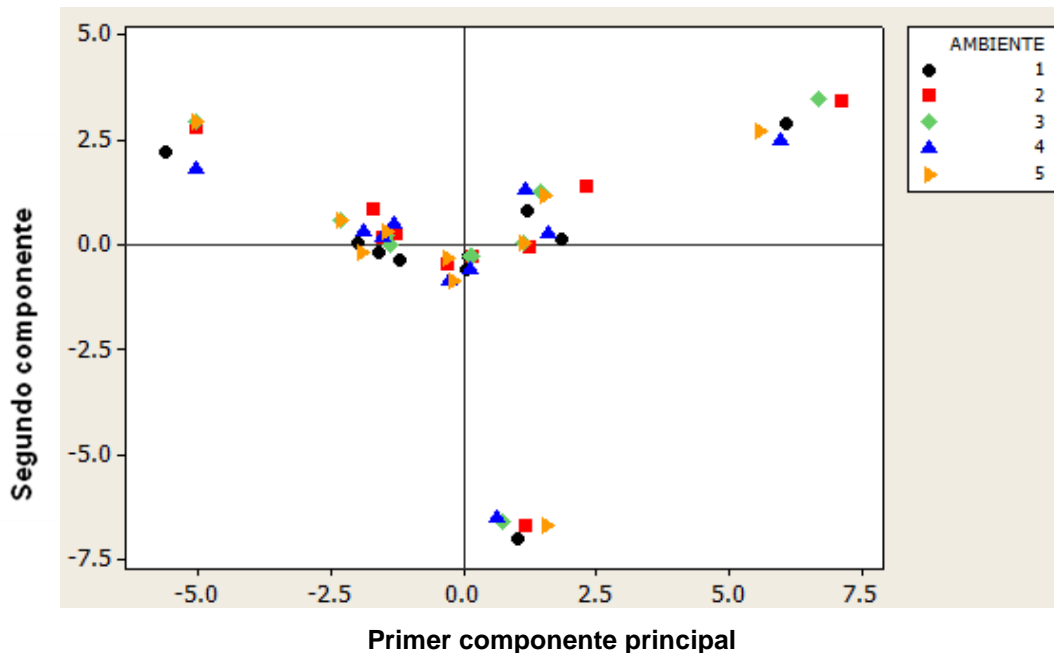


Figura 1.9. Distribución de los ambientes de evaluación en el plano cartesiano de los dos primeros componentes principales. (1: C6-06, 2: C6-PF-07, 3: PN-PF-07, 4: C6-SF-07, 5: PN-SF-07).

1.5.3 Evaluación de la homogeneidad

Para evaluar la homogeneidad se aplicaron los mismos principios que para determinar distinción; es decir, una variedad se definió por sus caracteres; así, la homogeneidad dentro de los exámenes DHE se calificó con base en las plantas fuera de tipo; para propósitos de este estudio y por tratarse de variedades registradas y definidas por sus caracteres, se han mantenido en aislamiento en tiempo y espacio para evitar contaminación, y por lo tanto, han conservado su condición de homogeneidad a través de los años y ambientes de evaluación.

Por otra parte, también se debe considerar la experiencia del examinador con respecto a una especie en estudio. Así pues, para determinar si una planta es fuera de tipo, deberá poder distinguirse claramente de las plantas que conforman la variedad, teniendo en cuenta las particularidades de su reproducción o multiplicación. El tipo de reproducción del cultivo de amaranto es mixto, así que ocurre tanto la auto-polinización como la polinización cruzada. Las flores unisexuales se encuentran en los glomérulos, es decir, en conglomerados de flores

ramificadas que en conjunto forman la panícula. Kulakow y Hauptli (1994) indican que el porcentaje de cruzamiento es del 6 al 34% y que el viento es el principal dispersor del polen.

En la calificación de la homogeneidad, también se debe considerar la expresión de un carácter en una parte de la planta, pero no sistemáticamente en toda la planta; entre las causas genéticas de una expresión atípica pueden señalarse las mutaciones y a los transposones; tal es el caso de la variedad Maros, que presentó puntos o motas en la inflorescencia, aunque no se ha hecho un estudio para determinar las causas de la pigmentación, ésta se hizo visible en cada uno de los ambientes de evaluación, y además es un carácter distintivo del resto de las variedades.

Es importante señalar que el total de las variedades han mantenido sus caracteres, aun con el diverso porcentaje de polinización cruzada que pudo darse, aunque en caso de que se hubiese dado, está fue entre la misma variedad; toda vez que la semilla se obtuvo de plantas de la parte central de la parcela

La UPOV (2008b) indica que también se deben tener en cuenta ciertos aspectos que puedan inducir a considerar atípica a una planta cuando no lo es. Los principales factores que dan lugar a este tipo de sesgo son:

- a) Efectos posicionales (la exposición a distintos niveles de luz o de temperatura, variaciones en la fertilidad, el pH o la humedad en la parcela y plantas cultivadas en maceta.
- b) La infección por enfermedades.
- c) La infestación por plagas.
- d) Los daños físicos (debido a condiciones medioambientales como sol, viento, precipitaciones, heladas, empleo de productos químicos (por ejemplo, chamuscado de herbicidas), etc.
- e) La falta de polinización (por ejemplo, una polinización pobre y desigual puede dar lugar a frutos deformados en la fresa).
- f) La incompatibilidad en injertos.

1.5.4 Evaluación de la estabilidad

La UPOV menciona que si las variedades son homogéneas a través de ambientes, son también estables en cuanto a su estructura genotípica. Los caracteres QN con tipo de observación MS son influenciados por el ambiente, y es precisamente una respuesta a las diferentes condiciones del medio, dadas por los ciclos o fechas de evaluación.

1.6 Conclusiones y Recomendaciones

Los resultados relevantes del presente estudio fueron:

1. La aplicación del SISNAVA permitió detectar que ocho de las diez variedades evaluadas fueron distintas.

2. Se propone ampliar a 20 unidades el valor absoluto de la suma de diferencias en variedades de amaranto al aplicar el SISNAVA.

3. De las variedades candidatas, sólo Mariel resultó ser distinta con respecto a las variedades de referencia; Brs-Alegría, en su descripción varietal es similar a Roza.

4. Se propone considerar la conveniencia de incluir en la guía para la descripción varietal de amaranto los descriptores: Inflorescencia, pigmentación del utrículo: Ausente (1) Presente (9) e Inflorescencia, variegado: Ausente (1) Presente (9); es necesario complementar la información que se pide en la guía en el apartado de caracteres adicionales del cuestionario técnico.

5. En el examen de homogeneidad, todas las variedades mostraron tener este requisito; pero para los caracteres con QN y con tipo de observación MS, la homogeneidad no resultó ser sinónimo de estabilidad.

1.7 Literatura Citada

- Adams, D., J. Kim, R. Jensen, M. Less, E. D. Slice and J. Walker. 2000. NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.20r. Exeter Software. New York, U.S.A.
- Coimbra, S. and R. Salema. 1994. *Amaranthus hypochondriacus*: seed structure and localization of seed reserves. *Annals of Botany* 74: 373-379.
- Dunn, G. and B. S. Everitt. 1982. *An Introduction to Mathematical Taxonomy*. Cambridge University Press. Mineola, New York. 152 p.
- Espitia, R. E. 1986. Situación actual y problemática del cultivo del amaranto en México. *In: Primer Seminario Nacional de Amaranto*. Colegio de Postgraduados. Chapingo, México. 101-108 p.
- Gethi J. G., J. A. Labate, K. R. Lamkey, M. E. Smith, and S. Kresovich. 2002. SSR variation in important U.S. maize inbred lines. *Crop Sci.* 42: 951-957.
- Hauptli, H. 1977. Agronomic potential and breeding strategy for grain amaranths. *In: Proc. 1st Amaranth Sem.* Maxatawy, PA. July 29, 1977. Rodale Press, Emmaus, PA. pp: 71-81.
- Heckenberger, M., M. Bohn, J. S. Ziegler, L. K. Joe, J. D. Hauser, M. Hutton and A. E. Melchinger. 2002. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties. I. Genetic and technical sources of variation in SSR data. *Mol. Breed.* 10: 181-191.
- Kauffman, C. S., and C. Reider. 1983. *Rodale Amaranth Germplasm Collection*. Rodale Press Inc. Emmaus, Pennsylvania, USA. 81 p.
- Khandaker L., M. B. Ali and S. Oba. 2009. Influence of cultivar and growth stage on pigments and processing factors on betacyanins in red amaranth (*Amaranthus tricolor* L.). *Food Science and Technology International* 15: 259-265.
- Kliewer, W. M. and R. E. Torres. 1972. Effect of controlled day and night temperature on grape coloration. *Am. J. Enol. Vitic.* 23:71-77.
- Kulakow, P. A. and H. Hauptli. 1994. Genetic characterization of grain amaranth. *In: Amaranth Biology, Chemistry and Technology*. Peredes-López, O. (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL. pp.9-22.
- National Research Council. 1984. *Amaranth: Modern prospects for an ancient crop*. National Academy Press. Washington, D.C. 81 p.

- Putnam, D. H. 1990. Agronomic practices for grain amaranth. *In*. Proc. 4th Natl. Amaranth Symp 23-25 Aug. 1990. Minnesota Ext. service. University of Minnesota. St. Paul. MN, USA pp: 151-162.
- Rohlf, F. J. 1993. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.2R. Exeter Software. Department of Ecology and Evolution. State University of New York. N.Y.
- Rojas, W. 2003. Análisis de la variabilidad genética en quinua. Caracterización Morfológica de Germoplasma. *In*: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). Boletín Técnico No. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. pp. 27-39.
- Romero-Severson, J., J. S. C. Smith, J. Ziegler, J. Hauser, L. Joe, and G. Hookstra. 2001 Pedigree analysis and haplotype sharing within diverse groups of *Zea mays* L. inbreds. *Theoretical and Applied Genetics* 103: 567-574.
- UPOV. 2002. Introducción general al examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales. UPOV/TG/1/3. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 28 p.
- UPOV. 2004a. Elaboración de las directrices de examen. Documento UPOV/ TGP/7/1. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 86 p.
- UPOV. 2004b. Statistical methods for testing distinctness. UPOV/DATA/BEI/04/7. Workshop on Data Handling. Beijing, June 9 to 11. 11p. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Beijing.
- UPOV. 2008a. Amaranto. Código UPOV: AMARA. (*Amaranthus* L. excluidas las variedades ornamentales). Directrices para la ejecución del examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad. Documento TG/247/1. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 36 p.
- UPOV. 2008b. Examen de la Homogeneidad. Documento conexo a la Introducción General al Examen de la Distinción, la Homogeneidad y la Estabilidad y a la Elaboración de Descripciones Armonizadas de las Obtenciones Vegetales (documento TG/1/3). UPOV TGP/10/1. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 17 p.
- UPOV. 2010. Introducción al sistema de la UPOV de protección de las variedades vegetales en virtud del convenio de la UPOV (DL-205). Notas de curso a distancia. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra.
- Van Eeuwijk, F. A., and J. R. Law. 2004. Statistical aspects of essential derivation, with illustrations based on lettuce and barley. *Euphytica* 137: 129-137.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES DE AMARANTO POR INTERMICROSATÉLITES (ISSR)

2.1 Resumen

Con el objetivo de identificar y distinguir variedades de amaranto mediante marcadores moleculares, y complementar con esta herramienta biotecnológica la caracterización con fines de protección de nuevas variedades vegetales, en el presente estudio se utilizaron 10 variedades de amaranto, cinco provenientes de Hungría, cuatro de México y una de Brasil, ocho de ellas con protección a los derechos del obtentor, y dos consideradas como candidatas: Brs-Alegría de Brasil y Mariel de México. Se emplearon 18 intermicrosatélites, elegidos por ser los más polimórficos en un estudio previo de 26. El número de alelos por locus varió de 5 a 23 con un tamaño de fragmento entre 450 y 7126 pb. Con 6 “primers” usados se logró obtener una caracterización molecular de cada variedad en base a los tamaños de fragmento observados. Las variedades Roza y Brs-Alegría, que son morfológicamente similares, molecularmente resultaron distintas; Maros y Eniko son las variedades con mayor similitud con una distancia genética de Dice $D_G=0.828$. Mariel es la variedad que presentó mayor disimilitud con Rojita, con un valor de $D_G=0.494$; sin embargo, se observó que las variedades Roza y Maros mostraron una distancia muy similar con una $D_G=0.684$ y 0.68 .

Palabras clave: Protección, derechos de obtentor, marcadores moleculares.

2.2 Abstract

In order to identify and distinguish amaranth varieties through molecular markers and to complement characterization using biotechnological tools for the protection of new plant varieties, in this study 10 amaranth varieties, five of those from Hungary, four from Mexico and one from Brazil were used; eight of them hold breeder rights protection and two (Brs- Alegría from Brazil and Mariel from Mexico) are considered as candidates: Eighteen intermicrosatellites were chosen as the most polymorphic ones based on results of a previous study

involving 26 of that group. The number of alleles per locus ranged from 5 to 23 with a fragment size between 450 and 7126 pb. Six primers were enough for performing molecular characterization for each variety based on the observed fragment size. Roza and Brs- Alegría varieties, that are morphologically similar, were molecularly distinct; Maros and Eniko are the most similar varieties with a Dice genetic distance of $D_G= 0.828$. Mariel is the variety that is most dissimilar to Rojita, with a $D_G=0.494$ value; however, Roza and Maros varieties registered a very similar distance with $D_G=0.684$ and 0.683 respectively.

Keywords: Protection, breeder rights, molecular markers.

2.3 Introducción

En la actualidad, a nivel nacional e internacional, la caracterización e identificación de variedades vegetales con fines de protección a los derechos del obtentor, se ha basado en la descripción morfológica. Solís y Andrade (2005) mencionan que los marcadores morfológicos fueron los primeros usados por el hombre; sin embargo, el uso de estos muestra algunas limitantes, toda vez que algunas de sus expresiones están influenciadas por el ambiente o por el manejo agronómico, como es el caso de la presencia o ausencia de espinas en el rosal, además, pueden ocurrir cambios epigenéticos que limitan el número de marcadores que pueden ser evaluados sin equivocación en la población segregante (Powell, 1992; Phillips-Mora *et al.*, 1995).

La investigación sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre especies cultivadas y silvestres son necesarias para una mejor comprensión de la evolución en *Amaranthus*. En este sentido, el grupo más estudiado de las especies del género *Amaranthus* es *A. hybridus*, que incluye los tres pseudocereales cultivados y sus probables progenitores silvestres *A. hybridus*, *A. quitensis* y *A. powellii*. Sauer (1950, 1967) menciona que existe confusión tanto en la literatura como en los herbarios, y en las colecciones de germoplasma, sobre la taxonomía entre estos taxones que están estrechamente relacionados.

Las relaciones evolutivas entre los amarantos de grano con sus parientes silvestres, han sido motivo de diversos estudios como los realizados por Sauer (1950 y 1967), Pal y Khoshoo (1972), Hauptli y Jain (1984), Gupta y Gudu (1991), Transue *et al.* (1994),

Lanoue *et al.* (1996), Chan y Sun (1997) y Sun *et al.* (1999). Según Sauer (1950, 1967), los tres amarantos para grano son nativos del Nuevo Mundo. La principal distribución geográfica de *A. cruentus* es en el sur de México y América Central; *A. hypochondriacus* se encuentra en el noroeste y centro de México, y *A. caudatus* se encuentra en la región de los Andes, en sudamerica.

Sobre la base de sus regiones y los registros históricos, se han propuesto dos hipótesis para explicar la evolución de las tres especies (Sauer, 1967, 1976). Hubo una sola domesticación de *A. cruentus* y *A. hybridus*, con los otros dos domesticables: *A. caudatus* y *A. hypochondriacus*; en segundo lugar, la evolución de las cruces de *A. cruentus* con otras dos especies silvestres, *A. powellii* en el norte y *A. quitensis* en el sur, como el principal cultivo fusionado con las especies nativas; mientras que en la tercera se plantea que cada una de las especies de grano fue domesticada de manera independiente en las distintas regiones y de diferentes especies silvestres: *A. cruentus* presumiblemente de *A. hybridus* en América Central, *A. hypochondriacus* de *A. powellii* en México, y *A. caudatus* de *A. quitensis* en América del Sur.

Investigaciones recientes de Espitia-Rangel *et al.* (2010) indican que en nuestro país, el género *Amaranthus* está distribuido a lo largo de México. *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* se distribuyen en la parte centro sur, y que *A. powellii* se ubica del centro al norte de México; se señala asimismo que *A. hybridus* puede ser el ancestro más probable de *A. cruentus*, pues *A. hybridus* se puede cultivar prácticamente en todo México, además de que *A. hypochondriacus* puede ser un híbrido entre *A. cruentus* y *A. powellii*, ya que *A. hypochondriacus* presentó un patrón de variación latitudinal parecido a *A. powellii* y un patrón de variación altitudinal similar a *A. cruentus*; siendo que todas ellas convergen en el Valle de México.

La investigación sobre la diversidad genética y las relaciones filogenéticas entre las especies cultivadas con las silvestres son necesarias para una mejor comprensión de la evolución en *Amaranthus*. La caracterización molecular de germoplasma ayuda en este propósito a los mejoradores en las selecciones de plantas y de materiales apropiados para el mejoramiento genético de nuevas variedades. Al respecto, se han realizado diversos estudios en el número cromosómico de híbridos y la fertilidad (Pal y Khoshoo, 1972; Gupta y Gudu, 1991), isoenzimas (Hauptli y Jain, 1984; Chan y Sun, 1997), de ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)

(Transue *et al.*, 1994; Chan y Sun, 1997), y sobre ADN y huellas genéticas (Sun *et al.*, 1999) que han arrojado información importante sobre la diversidad genética y evolución relacionada entre el amaranto de grano y sus parientes silvestres.

El mejoramiento a partir de la diversidad genética existente y de la que puede crearse mediante la hibridación ha dado como resultado la obtención de variedades con características superiores. En este sentido, la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) indica que una variedad es definida por sus caracteres, a la vez que en el Convenio de la UPOV también establece en el Artículo 6, inciso 2 del Acta de 1978; y en el Artículo 5, inciso 2 del Acta de 1991, que no se podrán exigir más requisitos que los de distinción, homogeneidad y estabilidad, y que el solicitante cumpla con las formalidades que cada estado miembro establezca, además de las cuotas o aranceles respectivos.

En la actualidad, la caracterización de variedades en todo el mundo es de vital importancia para su aplicación en los derechos de obtentor, la cual confiere la protección de variedades de explotación comercial. La protección se puede conceder si una variedad ha demostrado ser distinta de las variedades existentes, y si es lo suficientemente uniforme y estable en sus características relevantes. La singularidad de una variedad es establecida por las pruebas de Distinción, Uniformidad, y Estabilidad (DHE); por lo que la UPOV ha proporcionado directrices para el caso de las especies económicamente más útiles e importantes. Estas pruebas se basan principalmente en descriptores morfológicos y fisiológicos.

Cooke, (1995) menciona que debido a que el número de variedades existentes es muy grande, el método tradicional de examen DHE es largo y costoso, y se requieren grandes extensiones de tierra y personal calificado, y a menudo decisiones subjetivas; además debido a que muchos de los caracteres morfológicos son multigénicos o cuantitativos y por ende su expresión se ve afectada por factores ambientales, regularmente se requiere el registro de las observaciones durante dos ciclos consecutivos. Mientras que los marcadores moleculares pueden definir las diferencias en las secuencias de nucleótidos, sin verse afectados por la etapa de crecimiento, temporada, ubicación y la práctica agronómica (Kwon *et al.*, 2002), aprovechando que con los avances de la biología molecular se han desarrollado diversas técnicas que se pueden usar para propósitos de protección varietal, como complemento a la descripción morfológica. Por

lo anterior y con el fin de proteger las nuevas variedades vegetales y de complementar la descripción morfológica con herramientas biotecnológicas se planteó el siguiente objetivo e hipótesis.

Objetivo

Identificar y distinguir variedades de amaranto utilizando marcadores moleculares con fines de complementar con esta herramienta biotecnológica la información para la protección a los derechos de obtentor.

Hipótesis

Por la ausencia de efectos ambientales en la expresión de los marcadores moleculares, son garantía de eficiencia y consistencia en los resultados de pruebas de DHE.

2.4 Materiales y Métodos

2.4.1 Material genético

Se utilizaron ocho variedades de referencia y dos variedades candidatas de las especies *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus* provenientes de 3 países diferentes (Cuadro 2.1).

Cuadro 2.1. Variedades de amaranto utilizadas en el estudio.

No. de variedad	Variedad	País de procedencia	Especie	Estatus de la variedad
1	Rojita	México	<i>A. hypochondriacus</i>	Referencia
2	Nutrisol	México	<i>A. hypochondriacus</i>	Referencia
3	Revancha	México	<i>A. hypochondriacus</i>	Referencia
5	Roza	Hungría	<i>A. caudatus</i>	Referencia
5	Reka	Hungría	<i>A. caudatus</i>	Referencia
6	Edit	Hungría	<i>A. caudatus</i>	Referencia
7	Maros	Hungría	<i>A. caudatus</i>	Referencia
8	Eniko	Hungría	<i>A. caudatus</i>	Referencia
9	Brs-Alegría	Brasil	<i>A. caudatus</i>	Candidata
10	Mariel	México	<i>A. cruentus</i>	Candidata

2.4.2 Extracción de ADN

Cuando el cultivo se encontró en la fase de inicio de crecimiento, se recolectaron de cada una de las variedades pequeños trozos de hoja en 50 plantas por tres repeticiones; éstas se homogeneizaron, congelaron y deshidrataron en una liofilizadora (Freezw dry system/Freezone 4.5 LABCONCO ®) por un periodo de 24 horas para facilitar el macerado del tejido.

Se prepararon las soluciones stock cada una por separado; como se indica en los cuadros 2.2 y 2.3.

Cuadro 2.2 Preparación de soluciones stock para extracción de ADN

Reactivos	Volumen (mL)	Cantidad a agregar
1.- Tris HCL mM pH 8.0	200	24.2 g
2.- Na ₂ EDTA 2H ₂ O 20mM, pH 8.0 (Para disolver el EDTA se agregaron perlas de Hidróxido de sodio)	100	18 g
3.- NaCl 1.4 M; β-mercaptoetanol 0.2 %)	100	29.2 g
4.- CTAB 3%		6 g

Las soluciones se colocaron en frascos limpios y se etiquetaron para la preparación posterior del CTAB (Bromuro de alquiltrimetilo de amonio mixto).

Cuadro 2.3. Reactivos para preparar el CTAB

Reactivo	Volumen (200 mL)
1.- Tris HCL mM pH 8.0	20
2.- Na ₂ EDTA 2H ₂ O 20nM, pH 8.0	80
3.- NaCl 1.4 M; mercaptoetanol 0.2 %)	56
3.- CTAB 3%	6 gr

Al final se aforó con agua destilada esterilizada (44 mL) para 200 mL, se incubó a 60 °C por 1 h, y se mezcló ocasionalmente.

Se pesaron 0.3 g de cada material vegetal liofilizado y se depositaron en tubos Eppendorf de 1.5 mL; después, a cada una de las muestras se les adicionó 600 µL de CTAB; se incubaron a 60 °C por una hora mezclándose ocasionalmente. Se retiraron de la incubación e inmediatamente se adicionaron 600 µL de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1) y se mezcló, después se centrifugó a 14,000 rpm por 8 min; enseguida, de cada tubo se tomó la fase acuosa (parte

superior) y se colocó en un tubo Eppendorf nuevo. Se adicionaron 600 μL de isopropanol frío mezclando suavemente por inversión siete veces. Se incubó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 horas para precipitar el ADN. Después de este tiempo, se centrifugó a 14,000 rpm por ocho minutos y se eliminó el sobrenadante.

2.4.3 Lavado de la pastilla de ADN

El lavado se realizó con etanol frío al 70%, después se centrifugó a 14,000 rpm por siete minutos; se hizo un segundo lavado con acetato de sodio al 0.5 M y pH 5.2 para eliminar sales; a cada pastilla se le agregó de 80 a 100 μL y se centrifugó por 5 minutos a 14,000 rpm; este procedimiento se alternó hasta obtener una pastilla limpia y translúcida. El último lavado se realizó con etanol frío al 70% para eliminar el acetato de sodio. Al final la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente, disolviéndola posteriormente en 50 μL de agua destilada estéril. El ADN extraído de cada una de las variedades fue almacenado para su conservación en un congelador a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$; se prepararon alícuotas de ADN 1:30 para los trabajos subsecuentes.

2.4.4. Calidad del ADN

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%. En cada uno de los pozos del gel, se colocó una mezcla compuesta de 5 μL de solución stock del ADN y 1.5 μL de buffer de carga (azul de bromofenol 0.25%, xileno cianol FF 0.25% y glicerol al 30%). El buffer de corrida utilizado fue TBE 10X (Tris Base: 108 g, Acido bórico: 55 g, 40 mL 0.5M EDTA, pH 8.09), diluido a una proporción de 1X; la electroforesis se corrió a 95 Volts por un periodo de 30 min; transcurrido este tiempo el gel fue teñido con bromuro de etidio [1 μL de bromuro de etidio (10 mg mL^{-1}) por cada 100 mL de gel de agarosa]. Las imágenes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta Modelo Gel-Doc 2000, BIO RAD[®] y analizadas con el programa Quantity One 4.0.3. La calidad del ADN se definió como aceptable (Rojas, 2008)¹, al obtener una banda íntegra y uniforme de aproximadamente 12,000 pb de cada una de las variedades evaluadas. Se utilizó el marcador de escalera de peso molecular 1 kb (0.5 $\mu\text{g/carril}$).

¹ : Rojas M. R. I. 2008. Comunicación personal.

2.4.5 Síntesis de ISSRs (Intermicrosatélites o Inter-Repeticiones de Secuencias Simples)

Se realizaron pruebas con 26 primers (Cuadro 2.4) usados por Mapes (2007²); sin embargo, sólo se eligieron 18, debido a que ocho de ellos no presentaron alineamiento.

2.4.6 Mezcla de reacción y amplificación de fragmentos mediante PCR

Para la amplificación del ADN mediante PCR los reactivos se conjugaron en una mezcla de reacción de un volumen final de 25 µL. Estos reactivos se mezclaron en el orden y concentración que se indica en el Cuadro 2.5; el ADN y el primer se adicionó de manera individual y al final a cada tubo.

Cuadro 2.4 Iniciadores y su secuencia.

Número de Iniciador	Nombre del iniciador	Primer secuencia
1	17898A	(CA) ₆ -AC
2	17898B	(CA) ₆ -GT
3	17899A	(CA) ₆ -AG
4	844B	(CT) ₈ -GC
5	HB-10	(GA) ₆ -CC
6	HB-12	(CAC) ₃ -GC
7	HB-13	(GAG) ₃ -GC
8	HB-15	(GTG) ₃ -GC
9	HB-8	(GA) ₆ -GG
10	P14	(GACA) ₄
11	P15	(GACA) ₃ -RG
12	P16	YR- (GACA) ₃
13	P17	(GACAC) ₂
14	P27	(GACAC) ₂ -AG
15	P28	(GACAC) ₂ -CT
16	P29	(GACAC) ₃
17	814	(CT) ₈ -TG
18	M1	CAA- (GA) ₅

R= Purina (G or A)

Y= Pirimidina (C or T)

² : Mapes S. E. C. 2007. Comunicación personal.

Cuadro 2.5. Composición de la reacción de PCR para obtener intermicrosatélites de amaranto.

Componente	Concentración final	Volumen de reactivos (μL)
Agua		16.05
dNTPs	200 μM	0.5
Amortiguador	1X	2.5
Cloruro de Mg	1.5 mM	1.75
Taq ADN polimerasa	1 U	0.2
ADN	80 ng	2
Primer	10 pmol	2
		25 μL

La amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa se realizó en un termociclador de la marca BIO RAD[®], Serie 582BR. Las condiciones se muestran en el Cuadro 2.6.

Cuadro 2.6 Condiciones de temperatura del termociclador para la amplificación de intermicrosatélites en variedades de amaranto.

Ciclos	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Tiempo	Proceso
1	94	1 min	Desnaturalización inicial
40	94	40 seg	Desnaturalización
	40	1 min	Alineación
	72	1 min	Elongación o extensión
1	72	8 min	Extensión final

2.4.7 Separación por electroforesis y visualización de los productos amplificados

Los productos de amplificación fueron almacenados a -20°C , para su posterior separación por medio de electroforesis en un gel de agarosa al 2.5% a 80 Volts, que se dejó correr durante 5 horas. En cada uno de los pozos del gel se colocó una mezcla compuesta de 10 μL de producto de reacción y 1.5 μL de buffer de carga. El buffer de corrida utilizado fue TBE 1X. Como referencia, se incluyó un pozo con 0.7 μL de marcador de peso molecular 1 Kb (1 Kb ADN Ladder, Invitrogen[®], Figura 2.1).

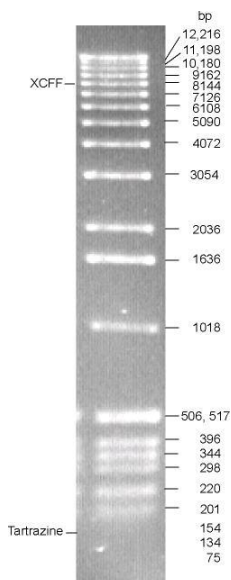


Figura 2.1 Visualización del tamaño de las bandas en pb que proporciona el marcador de escalera de peso molecular 1 kb (0.5 µg/carril).

Los geles se tiñeron con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta en un fotodocumentador (Modelo Gel Doc 2000, BIO RAD[®]); la foto del gel se tomó con el programa Quantity One 4.0.3, incluido en el equipo de fotodocumentación. Los resultados se imprimieron en papel fotográfico para su posterior análisis.

2.4.8 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos se utilizó el paquete computacional de NTSYS-pc versión 2.2R (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System).

Las bandas obtenidas se codificaron mediante código binario, asignando un valor de uno para denotar la presencia y cero para la ausencia de estas, conformando una matriz básica de datos o matriz binaria que fue empleada para generar la matriz de disimilaridad genética mediante el coeficiente de Dice (1945).

Los dendrogramas de agrupación de las variedades de amaranto, fueron derivados de la matriz de disimilaridad con el programa SAHN (Sequential Agglomerative Hierarchical Nested

Cluster Analysis) (Dunn y Everitt, 1982), del sistema de análisis multivariado y taxonómico numérico (NTSYS-pc 2.2R), utilizando el método del promedio aritmético no ponderado por pares UPGMA (Adams *et al.*, 2000).

La confiabilidad del dendrograma se probó mediante el método de remuestreo en las matrices de datos con Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, en el modulo “Transformation/Resample” y “Transformation/Summary” con 2000 remuestreos y por medio de una matriz de comparación entre la matriz de similitud generada de la matriz básica de datos y de una matriz promedio generada con el remuestreo con Bootstrap, realizada con el modulo “Graphics/Matrix comp. Plot”, todo con el paquete de NTSYS-pc 2.2R.

2.5 Resultados y Discusión

2.5.1 Distinción de variedades de amaranto usando intermicrosatélites

El ADN obtenido de las hojas fue de calidad y cantidad apropiada para la amplificación mediante PCR. Asimismo, los intermicrosatélites usados fueron altamente informativos y permitieron distinguir las 10 variedades de amaranto.

Los perfiles obtenidos en las tres repeticiones fueron muy similares en cada una de las variedades y no se encontraron diferencias al comparar las repeticiones de una misma variedad (Cuadro 2.7).

En el Cuadro 11A se muestran los resultados de la PCR de los 18 primers aplicados en las 10 variedades de amaranto. Como puede observarse, los fragmentos amplificados visualizados en los geles de agarosa se encuentran en un rango de 450 a 7126 pb.

La variabilidad genética observada en las huellas genómicas obtenidas en este estudio, se puede apreciar con seis de los primers usados, pues 11 muestran similitudes en el patrón de bandeo para algunas variedades, como son: (CA)₆-AC en Roza y Brs-Alegría; (CA)₆-GT , para Roza, Maros y Brs-Alegría; (GA)₆-AG en Revancha y Reka; (CT)₈-GC, las únicas que mostraron diferencias fueron Rojita y Revancha; (GAG)₃-GC en Maros, Eniko, Brs-Alegría y Mariel;

(GA)₆-GG en Rojita, Nutrisol, Eniko y Brs-Alegría; (GACA)₄ en Maros y Eniko; (GACAC)₂ para Roza, Maros y Eniko; (GACAC)₂-AG en Brs-Alegría y Mariel; (CT)₈-TC en Nutrisol, Edit, Eniko y Brs-Alegría, además de Roza, Maros y Mariel, y por último, también el ISSRs CAA-(GA)₅ muestra similitudes en Rojita y Nutrisol, Revancha y Reka, además de Roza, Maros, Brs-Alegría y Mariel; las similitudes antes mencionadas, pueden deberse a los orígenes de las variedades estudiadas y al parentesco que existe entre ellas, como las que mostraron los estudios realizados por Sauer (1967); Hauptli y Jain (1984); Sun *et al.*, (1999) y Xu y Sun (2001) en que las variedades evaluadas presentan una sola fuente en común: *A. hybridus*, emparentado con las especies *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*; por lo anterior Wassom y Tranel (2005) indicaron que las especies de *Amaranthus* son genéticamente muy similares.

Cuadro 2.7 Iniciadores, secuencia, tamaño y número de bandas amplificadas.

Número de Iniciador	Nombre del iniciador	Primer secuencia	Alelos (bp)	Número de bandas
1	17898A	(CA) ₆ -AC	850-2036	10
2	17898B	(CA) ₆ -GT	700-3635	13
3	17899A	(CA) ₆ -AG	785-3054	8
4	844B	(CT) ₈ -GC	887-1636	5
5	HB-10	(GA) ₆ -CC	506-3054	20
6	HB-12	(CAC) ₃ -GC	640-7126	23
7	HB-13	(GAG) ₃ -GC	495-1836	20
8	HB-15	(GTG) ₃ -GC	541-2505	22
9	HB-8	(GA) ₆ -GG	625-1875	13
10	P14	(GACA) ₄	506-4072	21
11	P15	(GACA) ₃ -RG	460-2254	20
12	P16	YR- (GACA) ₃	777-6108	20
13	P17	(GACAC) ₂	450-6108	18
14	P27	(GACAC) ₂ -AG	795-6108	13
15	P28	(GACAC) ₂ -CT	700-6108	18
16	P29	(GACAC) ₃	803-5090	21
17	814	(CT) ₈ -TG	1636-5090	5
18	M1	CAA- (GA) ₅	472-1242	10

R= Purina (G or A)

Y= Pirimidina (C or T)

Se observa que los ISSRs (CA)₆-AG, (CAC)₃-GC, (GACA)₃-RG, (YR- (GACA), (GACA)₂-CT y (GACAC)₃ arrojaron alelos con peso molecular diferente para cada variedad, por lo que estos podrían ser usados en específico para una prueba rápida de distinción entre variedades.

Gunjaca *et al.* (2008) en un estudio realizado en maíz con el uso de microsatélites, concluyeron que en esta especie fueron altamente informativos al presentar una mayor coherencia en el árbol genealógico y con más poder discriminatorio en comparación con el obtenido con los caracteres morfológicos; sin embargo, su integración en los protocolos del examen DHE aún depende de la resolución de varias cuestiones importantes; además, el número creciente de variedades candidatas, la disminución de su variabilidad en los caracteres morfológicos, y la internacionalización de la lista nacional de variedades en cada país, contribuye al aumento excesivo en los costos de las pruebas DHE, lo que crea la necesidad de mejorar los actuales procedimientos de evaluación de variedades. Al respecto, Suliman-Pollatschek *et al.* (2002) caracterizaron con microsatélites a 13 cultivares representativos de las especies *Lycopersicon pimpinellifolium*, *L. chilensea*, *L. pennellii*. De los 114 primers, sólo 93 produjeron polimorfismo entre especies y 59 entre cultivares de las especies; concluyeron que producir un perfil único para cada variedad requiere el uso de al menos cuatro primers; lo que hace que el uso de microsatélites para esta especie sea de difícil aplicación, sobre todo si se tiene en cuenta la diversa procedencia geográfica de los cultivares utilizados; posteriormente, He *et al.* (2003) usaron 129 primers, de los cuales, sólo 65 arrojaron bandas polimórficas en 19 cultivares de *Lycopersicon sculentum*. En este estudio, la identificación de los cultivares se logró hacer con un mínimo de cinco primers, lo que implica cuestionar el enfoque de esta técnica. Así, de lo obtenido en este estudio, posiblemente también se tenga que cuestionar el uso de ISSRs en el género *Amaranthus*, pues como ya se observa en el Cuadro 11A, se requieren seis primers para lograr diferenciar a las 10 variedades de amaranto. Las variedades que mostraron el mismo patrón de pb, posiblemente son las que se encuentran más emparentadas entre sí.

En 2003, Cooke *et al.* estudiaron la aplicación de los microsatélites en las pruebas DHE, de acuerdo con los principios de la UPOV como complemento o sustitución de las observaciones morfológicas, pues se ha convertido en un tema de gran interés en estudios científicos, y en consecuencia tema de debate en el seno de la UPOV.

Crespel *et al.* (2009) al evaluar los ISSR en la identificación y evaluación de las relaciones genéticas del cultivo del rosal, determinaron la diferenciación de 33 variedades de rosa, concluyendo que la técnica de ISSR es una herramienta potencialmente útil para la identificación

y evaluación de variedades en esta especie porque es simple, rápida, económica, fiable y altamente discriminante.

Varios investigadores han reportado el uso de marcadores moleculares para las pruebas de registro en los diferentes cultivos. RAPD, AFLP, y los marcadores SSR han sido ampliamente utilizados para toma de huellas en arroz (Singh *et al.*, 2004), pepino (Bernet, *et al.*, 2003), y canola (Tommasini *et al.*, 2003). Los resultados indican que los marcadores moleculares pueden ser utilizados para la preselección o la agrupación de variedades actuales, además de las variedades candidatas. Así, en este estudio, los intermicrosatélites resultan ser útiles para el examen DHE y el registro de variedades, y deben ser de valor en otras áreas tales como la identificación de variedades para la protección a los consumidores y para la solución de litigios relativos a la venta de semillas. La técnica de ISSRs ha sido usada en distintas especies; entre las que se encuentra el mijo perla, en la que Ashwani *et al.* (2006), la emplean en caracterización molecular por ser un método rápido y confiable para identificar diversidad en el germoplasma, no así para la elección de progenitores en los programas de mejoramiento; en tanto que Pasqualone *et al.* (2000) mencionaron que dos primers fueron suficientes para diferenciar un grupo de 30 variedades y 22 líneas de trigo duro en su estudio.

La tecnología genética moderna permite la identificación de genotipos con base en las secuencias únicas en su genoma. Esto abre la posibilidad para el desarrollo eficaz de un sistema para la identificación de variedades; así, Bojinov y Danailov (2009) aplicaron la técnica de ISSRs a un conjunto de especies silvestres y en variedades e híbridos F₁, de tomate como una técnica para la identificación de genotipos, y obtuvieron un perfil específico a partir del grupo de especies silvestres, mientras que las diferencias entre las formas domesticadas fueron considerablemente menores; por lo anterior, mejoradores y productores discuten el potencial y las limitaciones de la adopción de los ISSRs para incluirlos en los exámenes DHE.

2.5.2 Análisis de agrupamiento

Una vez analizada la matriz de ceros (0) y unos (1) generada a partir de los datos moleculares de las bandas ISSRs, se obtuvo el coeficiente de similitud de Dice (Cuadro 2.8); las cuales se encuentran entre valores cero y uno.

Cuadro 2.8. Coeficiente de similitud de Dice entre las variedades estudiadas.

	Rojita	Nutrisol	Revancha	Roza	Reka	Edit	Maros	Eniko	Brs-Alegría	Mariel
Rojita	0									
Nutrisol	0.801	0								
Revancha	0.703	0.696	0							
Roza	0.556	0.607	0.544	0						
Reka	0.547	0.579	0.566	0.600	0					
Edit	0.675	0.729	0.742	0.613	0.607	0				
Maros	0.614	0.643	0.575	0.687	0.571	0.628	0			
Eniko	0.561	0.620	0.543	0.719	0.553	0.596	0.828	0		
Brs-Alegría	0.581	0.612	0.553	0.763	0.563	0.619	0.797	0.807	0	
Mariel	0.494	0.531	0.512	0.684	0.520	0.558	0.683	0.721	0.752	0

El dendrograma de agrupamiento generado a partir de los datos moleculares se presenta en la Figura 2.2; en la que se aprecia que con las intersecuencias simples repetidas (ISSR) se pueden distinguir las diez variedades de amaranto. Los valores de similaridad presentaron una distancia D_G de 0.49 a 0.83 con el coeficiente de Dice.

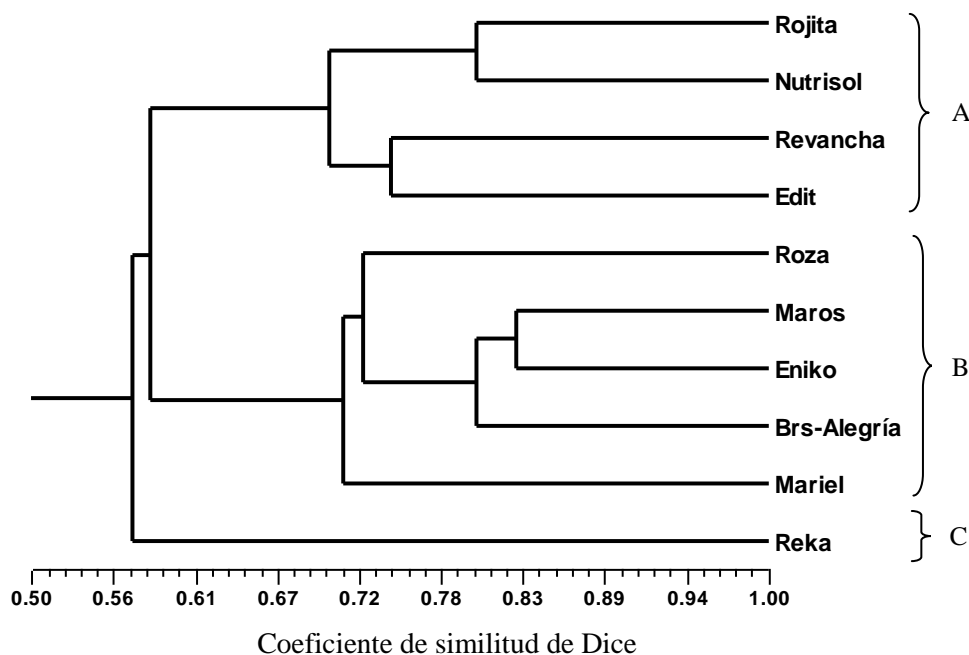


Figura 2.2. Dendrograma de 10 variedades de amaranto evaluadas por intermicrosatélites agrupadas con el método UPGMA utilizando el coeficiente de similitud de Dice.

En principio, se diferenciaron tres grupos: A, B y C. En el grupo A se encuentran las variedades Rojita, Nutrisol y Revancha, las cuales pertenecen a la especie *A. hypochondriacus*, además de Edit, que aunque está clasificada dentro de la especie *A. caudatus*, presenta caracteres morfológicos típicos de la especie *A. hypochondriacus*, principalmente en la estructura de la inflorescencia, como lo es el tamaño de las brácteas que son más largas que el utrículo, haciendo que la inflorescencia sea espinosa al tacto. En este grupo, las variedades que presentaron un mayor grado de similitud son Rojita y Nutrisol con una $D_G = 0.80$, y las que presentaron mayor disimilitud fueron Nutrisol y Edit ($D_G = 0.72$).

El segundo grupo (B) incluye las variedades Roza, Maros, Eniko y Brs-Alegría pertenecientes a la especie *A. caudatus* y Mariel a *A. cruentus*; en este grupo se observa que las variedades Maros y Eniko presentan gran similitud entre sí ya que su coeficiente de distancia genética de Dice es de 0.83 (Cuadro 2.8); lo que hace suponer que una de estas sea una variedad esencialmente derivada de la otra; al respecto, la UPOV (2009) menciona que una variedad esencialmente derivada es un cultivar que se deriva y que cumple con el genotipo de la variedad inicial y se distingue claramente de ésta por características fenotípicas, como un sólo rasgo de

herencia simple. Este fenómeno se ha incrementado desde el desarrollo de las biotecnologías que hacen posible la introducción de un único gen en una variedad; bajo este contexto, la característica de variedad esencialmente derivada se utiliza para proteger la propiedad intelectual de las obtenciones vegetales y con ello se fomenta el desarrollo continuo de nuevas variedades.

El tercer grupo (C) lo formó sólo la variedad Reka; que en el país de origen está clasificada dentro de la especie *A. mantegazzianus*; no obstante, de acuerdo con el agrupamiento del resto de las variedades, puede suponerse que pertenece a una especie distinta a las ya mencionadas; al respecto, Xu y Sun (2001) indican que el estudio de las especies del género *Amaranthus* es muy complejo. El objetivo de este trabajo no fue clasificar a las variedades por especie, sino distinguir a cada una de estas; así, esta variedad se diferencia totalmente del resto de los materiales estudiados en su aspecto molecular.

Xu y Sun (2001) mencionan que los análisis ISSRs y los AFLP en el género *Amaranthus* tienen un gran potencial para generar un gran número de caracteres informativos y establecer relaciones genéticas, tal como se muestra en la Figura 2.3; asimismo, cabe señalar la existencia de estudios que indican que las especies de amaranto presentan un ancestro en común, pero en el caso de Reka posiblemente se originó de otro ancestro y que por su grado de domesticación ha acumulado características agronómicas que la hacen comportarse de manera similar con las especies para grano, pero que en su genoma se siguen conservando las diferencias que impiden que esta variedad se agrupe bajo estos análisis, con alguna de las variedades ya clasificadas.

Mariel es la variedad que presentó mayor distancia de disimilitud con Rojita con un valor de $D_G=0.494$; sin embargo, se observa que con las variedades Roza y Maros guarda una distancia muy similar con una $D_G = 0.684$ y 0.683 respectivamente; las variedades más similares son Eniko ($D_G=0.721$) y Brs-Alegría ($D_G=0.752$). Con base en los resultados obtenidos, se aprecia que los ISSRs presentan el suficiente polimorfismo para diferenciar variedades; lo que está acorde con Bojinov y Danailov (2009), quienes mencionan que estos marcadores moleculares tienen la capacidad de identificar variación dentro de genotipos individuales así como de resolver las diferencias entre genotipos altamente homogéneos como variedades de autopolinización de la especie *Lycopersicon esculentum*.

Este tipo de marcadores se ha utilizado en genética en la toma de huellas genéticas (Blair *et al.*, 1999), marcadores de genes (Ammiraju *et al.*, 2001), detección de la variación clonal (Leroy y Leon, 2000), identificación de cultivos (Wang *et al.*, 2009), análisis filogenético (Gupta *et al.*, 2008), detección de inestabilidad genómica (Anderson *et al.*, 2001), y la evaluación de la hibridación (Wolfe *et al.*, 1998); así como en muchas especies vegetales y animales. La versatilidad de esta técnica, hace a los ISSRs útil para los investigadores interesados en diversos campos, tales como biología de la conservación y la investigación del cáncer.

2.6 Conclusiones

Los marcadores moleculares presentan una valiosa aportación a los exámenes DHE; así, los resultados relevantes de este estudio fueron:

1) Con la información obtenida en la presente investigación, se inicia la creación de la base de datos de la caracterización molecular para variedades de amaranto que cuentan con protección a los derechos de obtentor.

2) Es necesario continuar con la caracterización molecular de las nuevas variedades de amaranto de México, pues en los estudios realizados con este enfoque sólo se han considerado colectas de esta especie.

3) Los intermicrosatélites pueden considerarse una herramienta útil ya que son garantía de eficiencia y consistencia para complementar la caracterización morfológica en los resultados de los exámenes DHE.

2.7. Literatura citada

Adams, D., J. Kim, R. Jehsen, M. Les, E. D. Slice and J. Walker. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.20r. Exeter Software, New York, U.S.A.

- Ammiraju, J. S. S., B. B. Dholakia, D. K. Santra, H. Singh, M. D. Lagu, S. A. Tamhankar, H. S. Dhaliwal, V. S. Rao, V. S. Gupta and P. K. Ranjekar. 2001. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat. *Theor. Appl. Genet.* 102:726–732.
- Anderson, G. R., B. M. Brenner, H. Swede, N. Chen, W. M. Henry, J. M. Conroy, M. J. Karpenko, J. P. Issa, J. D. Bartos, J. K. Brunelle, G. P. Jahreis, M. S. Kahlenberg, M. Basik, S. Sait, M. A. Rodríguez-Bigas, N. J. Nowak, N. J. Petrelli, T. B. Shows and D. L. Stoler. 2001. Intrachromosomal genomic instability in human sporadic colorectal cancer measured by genome-wide allelotyping and inter-(simple sequence repeat) PCR. *Cancer Res* 61:8274–8283.
- Ashwani K., Lalit A., Vipin K. and Shailendra S. 2006. Inter simple sequence repeat (ISSR) analysis of cytoplasmic male sterile, male fertile lines and hybrids of pearl millet [*Pennisetum glaucum* (L.) R.Br.]. *Indian J. Crop Science* 1(1-2): 117-119.T
- Bernet, G. P., S. Bramardi, D. Calvache, E. A. Carbonell and M. J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122: 146–152.
- Blair, M. W., O. Panaud, S. R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet* 98: 780-792.
- Bojinov, B. M. and Z. H. P. Danailov. 2009. Applicability of ISSRs for genotype identification in a tomato breeding collection. *Acta Hort. (ISHS)* 830:63-70. http://www.actahort.org/books/830/830_6.htm.
- Chan, K. F., and M. Sun. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* 95: 865-873.
- Cooke, R. J. 1995. Varietal identification of crop plants. *In: New Diagnostics in Crop Sciences.* Skerritt, J. H. and R. Appels (eds.). CAB Int. Wallingford. pp. 33–63.
- Cooke, R. J. Bredemeijer G.M.M., Ganal M. W., 2003. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica.* 132: 331-41.
- Crespel, L., A. Pernet, M. le Bris, S. Gudin and L. H. Saint Oyant. 2009. Application of ISSRs for cultivar identification and assessment of genetic relationships in rose. *Plant Breeding,* 128:501–506.
- Dice, L. R. 1945. Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26: 297-302.

- Dun, G. and B. S. Everitt. 1982. An introduction to Mathematical Taxonomy. Cambridge University Press. Mineola, New York. 152 p.
- Espitia-Rangel, E., E. C. Mapes-Sánchez, C. A. Núñez-Colín y D. Escobedo-López. 2010. Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(3): 427-437.
- Gunjaca, J., I. Buhinicek, M. Jukic, H. Sarcevic, A. Vragolovic, Z. Kozic, A. Jambrovic, and I. Pejic. 2008. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica* 161: 165–172.
- Gupta, S. K., J. Souframanien and T. Gopalakrishna. 2008. Construction of a genetic linkage map of black gram, *Vigna mungo* (L.) Hepper, based on molecular markers and comparative studies. *Genome* 51:628–637.
- Gupta, V. K., and S. Gudu. 1991. Interspecific hybrids and possible phylogenetic relations in grain amaranths. *Euphytica* 52: 33-38.
- Hauptli, H., and S. Jain. 1984. Allozyme variation and evolutionary relationships of grain amaranths (*Amaranthus* spp.). *Theor. Appl. Genet.* 69: 153–165.
- He, C., V. Poysa and K. Yu. 2003. Development and characterization of simple sequence repeat (SSR) markers and their use in determining relationships among *Lycopersicon esculentum* cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 106: 363- 373.
- Kwon, Y. S., K. M. Kim, D. H. Kim, M. Y. Eun and J. K. Sohn. 2002. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci associated with plant regeneration ability in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Cells* 14: 24–28.
- Lanoue, K. Z., P. G. Wolf, S. Browning and E. E. Hood. 1996. Phylogenetic analysis of restriction-site variation in wild and cultivated *Amaranthus* species (Amaranthaceae). *Theor. Appl. Genet.* 93: 722-732.
- Leroy, X. J. and K. Leon. 2000. A rapid method for detection of plant genomic instability using unanchored-microsatellite primers. *Plant Mol Biol Rep* 18: 283.
- Pal, M., and T. N. Khoshoo. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. *J. Hered.* 63: 78-82.
- Pasqualone, A., C. Lotti, A. Bruno, P. de Vita, N. di Fonzo and A. Blanco. 2000. Use of ISSR markers for cultivar identification in durum wheat. *Options Méditerranéennes. Série A, Séminaires Méditerranéens* 40: 157-161.
- Phillips-Mora, W., H. Rodríguez y P. Fritz. 1995. Marcadores de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo con ejemplos de investigaciones en cacao (*Theobroma cacao*). Serie Técnica. Informe Técnico No. 252. CATIE. Turrialba, Costa Rica. 183 p.

- Powell, W. 1992. Plant genomes, gene markers, and linkage maps. *In: Biotechnology and Crop Improvement in Asia*. Moss, J. P. (ed.). International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics. Patancheru, India. pp. 297-322.
- Sauer, J. D. 1950. The grain amaranths: a survey of their history and classification. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 37: 561–619.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 54: 103-137.
- Singh, R. K., R. K. Sharma, A. K. Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari and T. Mohapatra. 2004 Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135: 135-143.
- Solís, R., L. Y. y A. Andrade T. 2005. ¿Qué son los marcadores moleculares? *Revista de Divulgación Científica y Tecnológica de la Universidad Veracruzana*. Vol. XVIII (1). En línea:
<http://www.uv.mx/cienciahombre/revistae/vol18num1/articulos/moleculares/index.htm>.
 (Consultado 15 de enero de 2010).
- Suliman-Pollatschek, S., K. Kashkush, H. Shats, J. Hillel and U. Lavi. 2002. Generation and mapping of AFLP, SSRs and SNPs in *Lycopersicon esculentum*. *Cell Mol Biol Lett* 7: 583-597.
- Sun, M., H. Chen and F. C. Leung. 1999. Low-cot DNA sequences for fingerprinting analysis of germplasm diversity and relationships in *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* 99: 464-472.
- Tommasini, L., J. Batley, G. M. Arnold, R. J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J. R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick and K. J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1091–1101.
- Transue, D. K., D. J. Fairbanks, L. R. Robison and W. R. Andersen. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. *Crop Sci.* 34:1385-1389.
- Wang, H. Z., Z. X. Wu, J. J. Lu, N. N. Shi, Y. Zhao, Z. T. Zhang and J. J. Liu 2009. Molecular diversity and relationships among *Cymbidium goeringii* cultivars based on inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. *Genetica* 136: 391-399.
- Wassom, J. J., and P. J. Tranel. 2005. Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species. *Journal of Heredity* 96(4): 410-416.
- Wolfe, A. D., Q. Y. Xiang and S. R. Kephart. 1998. Assessing hybridization in natural populations of penstemon (Scrophulariaceae) using hypervariable intersimple sequence repeat markers. *Mol Ecol* 71: 1107–1125.

Xu, F. and M. Sun. 2001. Comparative analysis of phylogenetic relationships of grain amaranths and their wild relatives (*Amaranthus*; Amaranthaceae) using internal transcribed spacer, amplified fragment length polymorphism, and double-primer fluorescent intersimple sequence repeat markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 21: 372–387.

UPOV. 2009. Notas explicativas sobre las variedades esencialmente derivadas con arreglo al acta de 1991 del convenio de la UPOV. Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Documento UPOV/EXN/EDV/1. Ginebra. 12 p.

DISCUSIÓN GENERAL

Las variedades mejoradas son el resultado del trabajo llevado a cabo en los programas de fitomejoramiento, los cuales requieren de grandes inversiones económicas y de varios años de investigación, y por esto es conveniente protegerlas legalmente. Para lograr esta protección, una variedad debe cumplir con los criterios de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE).

Al respecto, la UPOV (2002) indica que se deben elegir métodos adecuados para la interpretación de las observaciones con fines de caracterización. La estructura y el tipo de escala desde el punto de vista estadístico son decisivos para la elección de métodos, considerando además el tipo de carácter, las características de reproducción de la variedad, así como un diseño experimental apropiado.

Los caracteres morfológicos se han utilizado ampliamente para propósitos descriptivos y para distinguir variedades vegetales; sin embargo, se les cuestiona por el hecho de que los rasgos morfológicos son fuertemente afectados por las condiciones del ambiente; además, este enfoque es ineficiente por el tiempo y el costo involucrado (Singh *et al.*, 2004). Por otra parte, los criterios morfológicos por sí solos no son capaces de detectar diferencias entre algunas variedades que son fenotípicamente similares, pero que presentan diferente comportamiento agronómico.

Así, considerando los diferentes métodos para evaluar distinción, homogeneidad y estabilidad, y con base a los distintos análisis empleados en el presente estudio, es procedente un análisis de fondo para establecer criterios de evaluación que hagan confiables los ensayos de DHE.

El sistema SNICS para el agrupamiento de variedades (SISNAVA), aunque no emplea un método estadístico propiamente dicho, es una herramienta práctica y sencilla de utilizar para establecer la distinción entre variedades, incluyendo el total de los caracteres en sus distintas forma de expresión: cualitativos (QL) cuantitativos (QN) y pseudocualitativos (PQ).

Al concentrar los datos obtenidos en una matriz de doble entrada, se pueden apreciar los resultados de las sumas de diferencias, producto de la comparación entre variedades; lo cual ha sido de gran utilidad para la toma de decisiones sobre una variedad candidata en cuanto a si es distinta a otras existentes en el Registro Nacional de Variedades Vegetales, y con ello cubrir uno de los requisitos para el otorgamiento de un título de obtentor en nuestro país.

El análisis COYD (Cuadro 1.6), para el cual sólo se utilizan los caracteres QN, exige que el grado de diferencia sea suficientemente consistente durante varios años y tiene en cuenta la variación entre los años. Al aplicar este método en el cultivo de amaranto, se tiene la limitante de que los caracteres cuantitativos no son lo suficientemente importantes para lograr la distinción entre variedades; de tal forma que no genera mucha información que se pueda considerar en la toma de decisiones para que una variedad se defina como distinta. Otra condición importante a considerar, es que el amaranto presenta mucha plasticidad en cuanto a sus caracteres cuantitativos; aclarando que sus caracteres QL y PQ se conservan a través de los ambientes y años de evaluación, identificando mediante estos, a cada una de las variedades caracterizadas. Así, el COYD no arroja información que ayude a la toma de decisiones en el registro de variedades y protección a los derechos de obtentor. Hasta el momento no se ha ubicado información de respaldo donde se haya utilizado este sistema.

Los resultados obtenidos en los dendrogramas morfológicos también proporcionan información importante en cuanto a la similaridad (o disimilaridad) que existe entre las variedades de amaranto evaluadas, y de hecho se puede usar como complemento de la información obtenida con el SISNAVA, aunque los dendrogramas muestran de una manera más clara la agrupación de variedades, ya sea por su similitud o por el grado de distinción que existe entre estas.

El análisis de componentes principales sólo considera 27, e indica que 21 son los de mayor participación, con una proporción del 83.30 % del total de la variación, indicando que con ellos es factible desarrollar la caracterización en variedades de amaranto; no obstante, cabe señalar que en este grupo de 21 caracteres, no se incluyen en su totalidad los caracteres esenciales (*), los cuales son fundamentales para la armonización de las pruebas a nivel internacional; al respecto, en el primer componente se incluyen cinco y en el segundo solamente uno; cinco no fueron considerados por el análisis de componentes principales por ser constantes o por poseer datos incompletos, y los tres restantes no son considerados dentro de los cuatro primeros componentes principales. Por lo anterior, es aceptable lo que mencionan Rojas (2003) en el sentido de que aun no existen pruebas estadísticas de inferencia que permitan probar el significado de dichos caracteres, y por ello se debe considerar en gran parte la experiencia y los conocimientos derivados de trabajar con determinados cultivos.

El análisis de componentes principales no es una opción suficiente en la toma de decisiones para el registro y protección de variedades vegetales en cuanto al número de caracteres que se requieren para definir una variedad vegetal de amaranto, y más bien debiera considerarse necesario en el análisis crítico de los caracteres que conforman las guías técnicas.

En cuanto a la caracterización en las pruebas DHE desde el punto de vista molecular, cabe señalar que la aplicación de marcadores moleculares para el caso de amaranto aun es limitada; sin embargo, en un futuro esta herramienta puede ser usada como una opción complementaria para solicitar la protección a los derechos de obtentor, pues en estos casos se requiere de un examen rápido, efectivo y, en la medida de lo posible, que las características varietales se puedan evaluar fácilmente y que no sean influenciadas por el ambiente.

Considerando que la influencia ambiental en la expresión de los caracteres es muy marcada en la caracterización morfológica, y reconociendo el gran potencial que para este propósito representa el uso de los marcadores moleculares; en la UPOV se constituyó el grupo de trabajo en técnicas bioquímicas y moleculares (BMT, por sus siglas en inglés) en los años 1993-1994.

Durante muchos años el uso de marcadores bioquímicos con fines del examen DHE fue una opción, y finalmente se tienen avances, pues se han incluido los análisis de proteínas e isoenzimas en las directrices de examen de la UPOV para algunos cultivos como el trigo, el arroz y el maíz, aunque sólo representan características adicionales a ser utilizadas en circunstancias particulares. En este contexto, una de las funciones del BMT es coordinar las actividades relacionadas con las aplicaciones de marcadores para garantizar los máximos beneficios.

En principio, la posición formal de la UPOV y de las organizaciones de mejoradores de plantas, así como de la Federación Internacional de Semillas (de Europa), es que las pruebas basadas en marcadores moleculares no pueden ser usadas en el examen DHE como requisito para otorgar derechos de obtentor; sin embargo, se ha empezado a reconocer que los marcadores moleculares tienen gran futuro en relación con estos exámenes (Cooke *et al.*, 2003); y en este sentido Law *et al.* (1998) mencionan que la huella molecular de una variedad vegetal es de suma importancia para proteger los derechos del obtentor. Más interesante aun, es que el BMT ha centrado su atención en los microsatélites como el marcador de su elección (UPOV, 2010); sin embargo, Borja (2009) menciona que este tipo de marcadores tienen la desventaja de que su desarrollo es caro, la interpretación es difícil y pueden presentar una alta variación; mientras que los intermicrosatélites tienen la ventaja de que son más reproducibles que los RAPDs, y menos complejos que los AFLPs.

En abril de 2008, el Comité Técnico de la UPOV discutió sobre la utilización de los marcadores moleculares en función de las recomendaciones del Comité Consultivo de la propia unión. Para el caso del cultivo de papa se concluyó que a la fecha la información molecular no puede ser utilizada por sí sola para establecer la distinción de variedades, sino en combinación con caracteres morfológicos y con el objeto de gestionar las colecciones de variedades (UPOV, 2007a). En rosas, además de ser necesario contar con una base de datos fenotípicos y moleculares; se tiene que aun no existe necesidad urgente en introducir el uso de los marcadores moleculares en el examen DHE para esta especie, aunque se reconoce que los caracteres moleculares, combinados con los caracteres morfológicos pueden ser más informativos y confiables para la gestión de las colecciones de variedades; además, el grupo de especialistas en el rosal consideró importante para la evaluación, que la solicitud debe ser acompañada con el perfil de ADN y con la descripción oficial de la variedad, y asimismo que la autoridad oficial

conserve muestras de ADN (UPOV, 2007b). Para el caso de maíz (UPOV, 2007c), ya se han usado los marcadores para la identificación varietal en los casos de probable infracción a los derechos del obtentor; como por ejemplo, la discriminación de líneas endogámicas de maíz con uso de ISSR en pruebas DHE realizada por Gunjaca *et al.* (2008); la evaluación comparativa en líneas puras de maíz de acuerdo con el examen DHE utilizando marcadores morfológicos, fisiológicos y moleculares por Yadav y Singh (2010).

En este trabajo, los análisis de la caracterización molecular, realizados con el programa NTSYS mediante el método de remuestreo en las matrices de datos usando Bootstrapping con un $\alpha=0.05$, para la prueba DHE, mostraron una clasificación diferente al compararlos con la caracterización morfológica, pues en ésta última se agruparon principalmente por el color de la inflorescencia, mientras que en la caracterización molecular, las variedades se agruparon de acuerdo con la relación que existe entre las mismas por las especies a las que éstas pertenecen.

Las evidencias logradas son elementos que permiten discernir sobre la utilidad y funcionalidad del uso de los marcadores moleculares, toda vez que su introducción puede ofrecer varias ventajas; la primera es que muestran distinción entre variedades de amaranto, cuando esto en ocasiones no es posible con los caracteres morfológicos.

El uso de intermicrosatélites arrojó resultados favorables, considerándose como una de las herramientas que puede aceptar la UPOV como complemento a la caracterización morfológica, aceptando que es una herramienta para alcanzar resultados confiables y precisos; no obstante, habrá que contrastarlos, observar ventajas, virtudes y desventajas, buscando obtener conclusiones más próximas a la realidad que garanticen la distinción plena de variedades.

Por otra parte, es de señalar que los caracteres morfológicos, al ser afectados por las condiciones ambientales, mostraron variaciones considerables, justificando así el uso complementario de los marcadores moleculares; no obstante, habrá que considerar que la búsqueda de una correlación entre los ISSR y los datos morfológicos podría depender del número de marcadores utilizados, su polimorfismo intrínseco y la naturaleza de los caracteres morfológicos que se utilicen para la comparación.

Varios investigadores han reportado el uso de marcadores moleculares para las pruebas de registro en diferentes cultivos como en arroz, pepino y canola (Bernet *et al.*, 2003, Tommasini *et al.*, 2003, Singh *et al.*, 2004) utilizando técnicas de RAPDs, AFLPs y SSRs. Los resultados obtenidos en esta investigación indican que los marcadores moleculares pueden ser utilizados para la preselección o la agrupación de variedades actuales, además de las variedades candidatas; pudiendo ser de valor en otras áreas tales como la identificación de variedades para la protección de los consumidores y para la solución de litigios relativos a las semillas en uso comercial o de dominio público.

Genéticamente las variedades pueden tener alguna similitud y diferenciarse fenotípicamente; aunque también puede darse el caso de que sean muy parecidas en sus caracteres fenotípicos pero que genéticamente sean distintas; así, los marcadores moleculares presentan la capacidad para hacer este tipo de discriminaciones entre variedades muy cercanas, mientras que con la comparación mediante caracteres morfológicos no se puede lograr. Así, en el proceso de derivación, una nueva variedad puede estar alterada en un número mínimo de sus caracteres, y por lo tanto superar la prueba de diferenciación de la variedad original; sin embargo, "como selección" no afectará mayormente su estructura genética, situación en que el uso de los marcadores moleculares jugarían un papel importante en el contexto y concepto de "variedades esencialmente derivadas" (Van Eeuwijk y Law, 2004).

Otro aspecto importante es que los resultados obtenidos proporcionan información para dar inicio a la creación de la base de datos a nivel molecular de las variedades de referencia, ya que en México, al parecer, las únicas variedades consideradas como tales a nivel morfológico son las que se usaron en este estudio: Revancha, Nutrisol y Rojita.

Por último, puede decirse que los marcadores moleculares representan una valiosa aportación a los procedimientos del examen DHE; sin embargo, su aplicación aun depende de los tipos y número de marcadores a utilizar, del material genético, así como del seguimiento necesario para establecer los valores apropiados para probar la distinción, homogeneidad y estabilidad.

Con respecto a la caracterización molecular utilizando intermicrosatélites, puede decirse que es una técnica viable, reproducible entre laboratorios y materiales biológicos, y que puede ser usada como complemento a la caracterización morfológica de variedades.

5.1 Literatura citada

- Bernet, G. P., S. Bramardi, D. Calvache, E. A. Carbonell, and M. J. Asins. 2003. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber. *Plant Breeding* 122: 146–152.
- Borja, M. 2009. Molecular markers in variety identification. Spring mini conference. En línea: http://www.fleuroselect.com/uploads/2009.03_06.EDV_Molecular-Markers_Dr.Marise.Borja.ppt.pdf (Consultado 20 de febrero de 2011).
- Cooke, R. J., G. M. M. Bredemeijer, M. W. Ganal, R. Peeters, P. Isaac, S. Rendell, J. Jackson, M. S. Röder, V. Korzun, K. Wendehake, T. Areshchenkova, M. Dijcks, D. Laborie, L. Bertrand and B. Vosman. 2003. Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci. *Euphytica* 132: 331–341.
- Gunjaca J., I. Buhinicek, M. Jukic, H. Sarcevic, A. Vragolovic, Z. Kozic, A. Jambrovic, and I. Pejic. 2008. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data. *Euphytica* 161: 165–172.
- Law, J.R., P. Donini, R. M. D. Koebner, J. C. Reeves and R. J. Cooke. 1998. DNA profiling and plant variety registration. III: the statistical assessment of distinctness in wheat using amplified fragment length polymorphisms. *Euphytica* 102: 335-342.
- Rojas, W. 2003. Análisis de la variabilidad genética en quinua. Caracterización Morfológica de Germoplasma. In: Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos. Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 27-39p
- Singh, R. K., R. K. Sharma, A. K., Singh, V. P. Singh, N. K. Singh, S. P. Tiwari and T. Mohapatra. 2004. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica* 135: 135–143.
- Tommasini, L., J. Batley J., G. M. Arnold, R. J. Cooke, P. Donini, D. Lee, J. R. Law, C. Lowe, C. Moule, M. Trick, and K. J. Edwards. 2003. The development of multiplex simple sequence repeats (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl. Genet.* 106: 1091–1101.

- UPOV. 2002. Introducción general al examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad y a la elaboración de descripciones armonizadas de las obtenciones vegetales. UPOV/TG/1/3. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 28 p.
- UPOV. 2007a. *Ad hoc* crop subgroup on molecular techniques for potato. UPOV. BMT-TWA/Potato/2/7. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneve. 8p.
- UPOV. 2007b. *Ad hoc* crop subgroup on molecular techniques for rose. UPOV.UPOV/ BMT-TWO/Rose/2/6. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Angers, France. 9 p.
- UPOV. 2007c. *Ad hoc* crop subgroup on molecular techniques for maize. UPOV/ BMT-TWA/Maize/2/12. International Union for the Protection of New Varieties of Plants. Geneve. 10p.
- UPOV. 2010. Posible utilización de los marcadores bioquímicos y moleculares en el examen de la distinción, homogeneidad y la estabilidad. UPOV/BMT/DUS Draft. Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales. Ginebra. 232 p.
- Van Eeuwijk F.A. and J. R. Law. 2004. Statistical aspects of essential derivation, with illustrations based on lettuce and barley. *Euphytica* 137: 129-137.
- Yadav V. K. and I. S. Sing. 2010. Comparative evaluation of maize inbred lines (*Zea mays* L.) according to DUS testing using morphological, physiological and molecular markers. *Agricultural Sciences* 1(3): 131-142.

APÉNDICE

Cuadro 1A. Caracterización de la variedad Rojita en siete ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	3	3	3	3	3	3	3
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	5	5	5	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	3	3	5	3	3	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	7	7	5	5	7	5	7
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	1	1	1	1	1	1	1
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	2	2	2	2	2	2	2
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	5	5	3	3	3	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	2	2	2	2	2	2	2
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	0	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	3	3	3	3	3		
25	Inflorescencia: compacidad (ICOM)	5	5	5	5	5		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	5		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	3	3	3	3	5		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3	3	3	3	3		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	2	2	2	2	2		
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	3	3	5		
33	Planta: época de madurez (PEM)	5	5	5	5	5		
34	Planta: longitud (PL)	3	3	3	5	5		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	9	9	9	9	9		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)	1	1	1	1	1		
39	Semilla: tipo (ST)	2	2	2	2	2		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	5	5	5		

[†]:1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 2A. Caracterización de la variedad Nutrisol en siete ambientes

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	7	7	7	7	7	7	7
4	Hoja joven: longitud (HJL)	7	7	7	5	5	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	7	5	7	3	7	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	5	7	5	7	5	7	7
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	1	1	1	1	1	1	1
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	4	4	4	4	4	4	4
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	0	0	0	0	0	0	0
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	3	3	3	3	3	3	3
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	5	7	7	5	5	3	5
14	Época de floración (EF)	7	7	7	7	7	5	7
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	9	9	9	9	9	9	9
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	9	9	9	9	9	9	9
19	Limbo: color principal (LCP)	3	3	3	3	3	3	3
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	4	4	4	4	4		
25	Inflorescencia: compacidad (ICOM)	5	5	5	5	5		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	5		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	3	3	3	5	3		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3	3	3	3	3		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	2	2	2	2	2		
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	5	5	5	5	3		
33	Planta: época de madurez (PEM)	5	7	7	7	7		
34	Planta: longitud (PL)	5	7	5	5	5		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	9	9	9	9	9		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)	1	1	1	1	1		
39	Semilla: tipo (ST)	2	2	2	2	2		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	5	3	5		

[†]:1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 3A. Caracterización de la variedad Revancha en siete ambientes

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	1	1	1	1	1	1	1
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	5	5	5	5	5	5	5
4	Hoja joven: longitud (HJL)	7	7	5	7	5	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	7	7	5	5	5	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	3	3	3	7	3	7	7
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	1	1	1	1	1	1	1
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	0	0	0	0	0	0	0
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	2	2	2	2	2	2	2
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	3	3	3	3	3	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	1	1	1	1	1	1	1
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	2	2	2	2	2		
25	Inflorescencia: compacidad (ICOM)	5	5	5	5	5		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	7	7	7	7	7		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	7	3	3	3	3		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	2	2	2	2	2		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	2	2	2		
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	3	5	3		
33	Planta: época de madurez (PEM)	5	5	5	5	5		
34	Planta: longitud (PL)	3	5	3	5	3		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	1	1	1	1	1		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)	1	1	1	1	1		
39	Semilla: tipo (ST)	1	1	1	1	1		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	3	5	5	5	5		

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 4A. Caracterización de la variedad Roza en seis ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	7	7	7	7	7	7	7
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	7	5	5	3	
5	Hoja joven: anchura (HJA)	7	3	7	5	5	3	
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	3	7	5	3	3	3	
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2	
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2	
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	5	5	5	5	5	5	
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1	
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3	
14	Época de floración (EF)	3	3	3	3	3	3	
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	2	2	2	2	2	2	
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	9	9	9	9	9	9	
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	7	7	7	7	7	7	
19	Limbo: color principal (LCP)	2	2	2	2	2	2	
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1	
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	
24	Inflorescencia: color (IC)	3	3	3	3	3		
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	7	7	7	7	7		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	7		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	7	3	5	3	5		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	2	2	2	2	2		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	1	1	1		
31	Inflorescencia: porte (IP)	5	5	5	5	5		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	5	3	3		
33	Planta: época de madurez (PEM)	5	5	5	5	5		
34	Planta: longitud (PL)	3	5	3	3	3		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	9	9	9	9	9		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)	1	2	2	2	2		
39	Semilla: tipo (ST)	1	1	1	1	1		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	5	3	5		

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF).

Cuadro 5A. Caracterización de la variedad Reka en siete ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	7	7	7	7	7	7	7
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	5	5	7	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	3	3	3	3	7	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	7	7	7	7	5	5	7
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	1	1	1	1	1	1	1
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	1	1	1	1	1	1	1
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	2	2	2	2	2	2	2
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	5	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	5	5	5	5	3	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	1	1	1	1	1	1	1
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	5	5	5	5	5		
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	3	3	3	3	3		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	5		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	2	2	2	2	2		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	7	5	5	5	5		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3	3		3	3		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1		1	1		
31	Inflorescencia: porte (IP)	7	7		7	7		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3			5		
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	5			5		
34	Planta: longitud (PL)	3	3			5		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	9	9			9		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	1	1			1		
37	Semilla: color (SC)	3	3			3		
38	Semilla: forma (SF)	2	2			2		
39	Semilla: tipo (ST)	1	1			1		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	3			3		

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 6A. Caracterización de la variedad Edit en siete ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	7	7	7	7	7	7	7
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	5	5	5	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	3	3	3	3	3	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	5	5	5	5	5	7	3
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	1	1	1	1	1	1	1
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	2	2	2	2	2	2	2
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	3	3	3	3	3	3	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	3	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	3	3	3	3	3	3	3
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	4	4	4	4	4		
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	7	7	7	7	7		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	7	7	7	7	7		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	2	2	2	2	2		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	7	7	7	3	5		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3	3	3	3	3		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	2	2	2	2	2		
31	Inflorescencia: porte (IP)	1	3	3	3	3		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	3	5	3		
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	3	3	3	3		
34	Planta: longitud (PL)	3	3	3	3	3		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	2	9	9	9	9		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)	1	2	2	2	2		
39	Semilla: tipo (ST)	2	2	2	2	2		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	5	5	5		

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 7A. Caracterización de la variedad Maros en siete ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]						
		1	2	3	4	5	6	7
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	5	5	5	5	5	5	5
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	7	5	5	5	5
5	Hoja joven: anchura (HJA)	5	5	7	5	5	5	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	3	3	3	5	3	3	5
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	0	0	0	0	0	0	0
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	3	5	5	3	3	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	1	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	1	1	1	1	1	1	1
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	0	1	0	1	0	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	2	2	2	2	2		
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	7	5	5	5	5		
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	7	5	5	5	5		
27	Inflorescencia: tipo (IT)	2	1	1	1	1		
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	3	3	3	5	3		
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	2	2	2	2	2		
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	1	1	1		
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3		
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	3	3	3		
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	5	5	5	3		
34	Planta: longitud (PL)	3	3	3	3	3		
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	1	1	1	1	1		
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2		
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1		
38	Semilla: forma (SF)		1					
		2	0	2	2	2		
39	Semilla: tipo (ST)	1	9	1	1	1		
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	3	5	5		

[†]: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF), 7(PN-07-TF).

Cuadro 8A. Caracterización de la variedad Eniko en seis ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]					
		1	2	3	4	5	6
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	5	5	5	5	5	5
4	Hoja joven: longitud (HJL)	5	5	5	5	3	5
5	Hoja joven: anchura (HJA)	5	5	5	5	5	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	3	5	5	5	3	5
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	1	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	0	0	0	0	0	0
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	3	5	3	5	3
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	1	1	1	1	1	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	1	1	1	1	1	1
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	2	2	2	2	2	2
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	5	5	5	5	5	5
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	5	5
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1	1
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	7	5	3	3	3	3
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	2	2	2	2	2	2
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	1	1	1	1
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3	3
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	3	3	3	3	3
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	5	5	5	5	5
34	Planta: longitud (PL)	3	3	5	3	3	3
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	1	1	1	1	1	1
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2	2
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1	1
38	Semilla: forma (SF)	2	2	2	2	2	2
39	Semilla: tipo (ST)	2	2	1	2	1	1
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	5	5	5	5	5

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF).

Cuadro 9A. Caracterización de la variedad Brs-Alegría en seis ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]					
		1	2	3	4	5	6
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	2	2	2	2	2	2
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	9	9	9	9	9	9
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	7	7	7	7	7	7
4	Hoja joven: longitud (HJL)	7	5	5	3	3	3
5	Hoja joven: anchura (HJA)	7	7	7	5	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	5	3	3	3	3	5
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	2	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	5	5	5	5	5	5
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	5
14	Época de floración (EF)	5	3	3	3	3	5
15	Tallo: color (TC)	1	1	1	1	1	1
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	2	2	2	2	2	2
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	9	9	9	9	9	9
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	7	7	7	7	7	7
19	Limbo: color principal (LCP)	2	2	2	2	2	2
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	3	3	3	3	3	
25	Inflorescencia: compacidad (ICO M)	7	7	7	7	7	
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	5	5	5	5	5	
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	1	1	
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	5	3	3	3	7	
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	2	2	2	2	2	
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	1	1	1	
31	Inflorescencia: porte (IP)	5	5	5	5	5	
32	Inflorescencia: longitud (IL)	5	5	5	3	3	
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	3	3	3	3	
34	Planta: longitud (PL)	3	5	5	3	5	
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	9	9	9	9	9	
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	2	2	2	2	
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1	
38	Semilla: forma (SF)	2	2	2	2	2	
39	Semilla: tipo (ST)	1	1	1	1	1	
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	3	5	3	5	

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF).

Cuadro 10A. Caracterización de la variedad Mariel en seis ambientes.

No.	Carácter	Ambientes [†]					
		1	2	3	4	5	6
1	Cotiledones: pigmentación antociánica (CPA)	1	1	1	1	1	1
2	Plántula: Pigmentación antociánica del hipocotilo (PPAH)	1	1	1	1	1	1
3	Plántula: intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo (PICAH)	0	0	0	0	0	0
4	Hoja joven: longitud (HJL)	3	5	5	5	5	5
5	Hoja joven: anchura (HJA)	3	3	3	3	3	3
6	Hoja joven: proporción largo/anchura (HJPLA)	7	7	5	5	5	5
7	Hoja joven: posición de la parte más ancha (HJPPMA)	2	2	2	2	2	2
8	Hoja joven: prominencia de nervaduras (HJPN)	3	2	2	2	2	2
9	Hoja joven: color principal del haz (HJCPH)	2	2	2	2	2	2
10	Hoja joven: distribución del segundo color en el haz (HJDSCH)	1	0	0	0	0	0
11	Hoja joven: color del envés (HJCE)	1	1	1	1	1	1
12	Hoja: margen (HM)	1	1	1	1	1	1
13	Planta: época de aparición de inflorescencia (PEAI)	3	3	3	3	3	3
14	Época de floración (EF)	5	3	3	3	3	3
15	Tallo: color (TC)	2	2	2	2	2	2
16	Tallo: color de las rayas (TCR)	0	0	0	0	0	0
17	Pecíolo: pigmentación antociánica (PPA)	2	1	0	1	0	1
18	Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica (PIPA)	0	0	0	0	0	0
19	Limbo: color principal (LCP)	2	2	2	2	2	2
20	Lámina de la hoja: presencia de mancha (LPM)	1	1	1	1	1	1
21	Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo (LTMCR)	0	0	0	0	0	0
22	Limbo: color de la mancha (LCM)	0	0	0	0	0	0
23	Limbo: forma de la mancha (LFM)	0	0	0	0	0	0
24	Inflorescencia: color (IC)	1	1	1	1	1	1
25	Inflorescencia: compacidad (ICOM)	7	7	7	7	7	7
26	Inflorescencia: densidad de los glomérulos (IDG)	7	7	7	7	7	7
27	Inflorescencia: tipo (IT)	1	1	1	2	1	1
28	Inflorescencia: número de flores femeninas por glomérulo (INFFXG)	3	3	3	3	3	3
29	Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo (ILBRU)	3	1	1	1	1	1
30	Inflorescencia: hábito de crecimiento (IHC)	1	1	1	1	1	1
31	Inflorescencia: porte (IP)	3	3	3	3	3	3
32	Inflorescencia: longitud (IL)	3	5	5	3	3	3
33	Planta: época de madurez (PEM)	3	5	5	5	5	5
34	Planta: longitud (PL)	3	5	5	5	3	3
35	Tallo: pigmentación antociánica de la base (TPAB)	1	1	1	1	1	1
36	Tallo: forma de la sección transversal (TFST)	2	9	2	2	2	2
37	Semilla: color (SC)	1	1	1	1	1	1
38	Semilla: forma (SF)	2	2	2	2	2	2
39	Semilla: tipo (ST)	1	1	1	1	1	1
40	Semilla: peso de 1000 semillas (SPMS)	5	3	5	3	5	5

†: 1(C6-06), 2(C6-07-PF), 3(PN-07-PF), 4(C6-07-SF), 5(PN-07-SF), 6(C6-07-TF).

Cuadro 11A. Bandas presentes (en bp) en 10 variedades de amaranto para cada uno de los iniciadores utilizados.

	Rojita	Nutrisol	Revancha	Roza	Edit	Reka	Maros	Eniko	Brs-Alegría	Mariel
(CA)₆-AC	1361	1796	1475	1716	2036	1475	1716	1716	1716	1716
	1018	1361	1361	1475	1796	1361	1475	1475	1475	1475
		1269	1269	1316	1475	1269	1361	1316	1361	1361
		1224	1224	1269	1361	1224	1269	1269	1269	1269
		1018	1018	1018	1269	1064	1224	1224	1018	1224
				850	1224	1018	1064	1018	850	1018
					1018	850	1018	850		850
(CA)₆-GT	1728	3635	2036	2952	2952	3635	2952	3635	2952	2952
	1630	1696	1728	1069	1630	2036	1069	2952	1069	1069
	1069	1430	1069	832	1069	1630	832	832	832	832
	832	1018	832	785	832	1069	785	785	785	785
	785	832	785		785	832				755
	755	785			785	785				
(CA)₆-AG	2254	1512	1512	1327	1327	1512	2254	3054	2254	2254
	1512	1327	1419	956	956	1327	1327	2254	1419	1419
	1419	832	1327	832	832	956	956	1419	1327	1327
	832	785	956	785	785	832	832	1327	956	956
	785		832			785	785	956	832	832
			785					832	785	785
(CT)₈-GC	1636	1340	1206	1206	1340	1340	1206	1206	1206	1340
	1340	1206		958	1206	1206	958	958	958	1206
	1206	958		887	958	958	887	887	887	958
	887	887								887
(GA)₆-CC	2399	2036	2763	1817	2763	2763	1817	3054		1817
	1817	1817	1836	1574	1817	1836	1419	1817	1817	1745
	1419	1419	1817	1419	1419	1817	1296	1745	1745	1574
	1296	1296	1296	1296	1296	1296	1018	1574	1419	1419
	937	937	937	1018	937	937	937	1419	1296	1296
	816	816	816	937	816	816	816	1296	1018	1203
	762	762	762	869	762	762	762	1018	816	1018
	708	708	708	816	708	708			762	869
	567	567	567	762	567	567			567	816
	506	506	506	708	506	506				762
				641						708
				567						641
				506						567
									506	

Cuadro 11A. Continuación...

(CA C) ₃ -GC	4072	2515	7126	4072	5090	6108	4072	4072	4072	2515
	2515	1201	6108	2515	4072	4072	3490	2515	2515	1820
	2455	1086	4072	1820	2515	2515	2515	1820	1820	1728
	2275	895	3490	1636	2455	1636	2036	1636	1636	1636
	2036		2515	1201	2275	1201	1820	1201	1201	1201
	1521		2455		2036		1521	1086	1086	1086
	1361		2275		1820		1361	1018	1018	1018
	1201		2036		1521		1201	895	956	895
	1086		1636		1430		1086	773	895	
			1201		1086		1018	640		
			1086				956			
							895			
							854			
						773				
						640				
(GAG)3-GC	1802	1802	1802	1224	1636	1636	1836	1836	1836	1836
	1430	1430	1430	954	1106	1312	1430	1430	1430	1430
	1224	1224	954	902	1018	1018	1224	1224	1224	1224
	954	1018	902	698	954	954	954	954	954	954
	902	954	839	647	902	902	902	902	902	902
	839	902	800	596	736	775	839	839	839	839
	800	839	698	545	698	698	698	698	698	698
	698	800	647		647	647	647	647	647	647
	647	698	500		545	500	596	596	596	596
	545	647			495					
	500	545								
		500								
(GTG) ₃ -GC	1999	1999	1781	1115	1890	1999	2005	1890	1781	1781
	1890	1890	1636	948	1781	1781	2271	1781	1636	1115
	1781	1781	1587	907	1505	1636	2036	1636	1587	948
	1636	1636	1278	852	1408	1587	1999	1505	1278	907
	1408	1408	976	755	948	1408	1781	1408	1115	852
	1278	1278	907	700	907	1278	1408	1115	948	755
	1115	1115	852	541	852	1115	1278	948	907	700
	948	948			789	976	1115	907	852	575
	907	907			700	948	948	852	755	
	852	852			575	907	907	755	700	
	700	755				852	852	700	575	
		700				700	776	575		
		541					755			
						700				
						541				
(GA)6-GG	1875	1875	1875	1461	1665	1875	1394	1461	1461	1461
	1750	1750	1394	1394	1595	1750	1179	1394	1394	1394
	1394	1394	1313	1179	1394	1394	1018	1179	1179	1179
	1313	1313	1179	1018	1313	1313	830	1018	1018	1018
	1179	1179	1018		1179	1179	756	830	830	830
	1018	1018	913		1018	1018	625			756
	830	830	830		830	830				625
			756							
			625							

Cuadro 11A. Continuación...

(GACA)₄	4072	3359	4072	2578	2578	4072	4072	4072	3359	3359	
	3359	2578	3359	2612	2612	3359	2578	2578	2986	2986	
	2986	2612	2578	2273	2273	2578	2612	2612	2578	2578	
	2578	2273	2612	2036	2036	2612	1719	1719	1719	1719	
	2612	2036	2273	1852	1852	2273	1606	1606	1606	1606	
	2273	1852	2036	1719	1719	2036	1430	1430	1518	1518	
	2036	1719	1852	1606	1606	1852	1341	1341	1430	1430	
	1852	1518	1719	1518	1518	1719	1150	1150	1341	1341	
	1719	1430	1518	1430	1430	1518	835	835	835	993	
	1606	1341	1430	1341	1341	1430				920	
	1518	835	1341	1282	1282	1341				701	
	1430		835	835	835	920				585	
	1341					835				506	
	1282										
	835										
	(GACA)₃-RG	2254	2254	2254		1545	2254	1862	1862	1334	1334
		1742	1334	1742	1334	1334	1334	1545	1545	1063	1063
1334		1063	1334	1063	1063	1063	1334	1334	991	991	
1063		991	1063	991	991	991	1183	1063	694	694	
991		917	991	735	843	735	1063	991	661	661	
917		789	917	694	490	490	991	694	580	580	
789		735	843	580			694	661	490		
735		694	490	500			661	580			
694		661					580	490			
661		580					490	480			
580		490					480	470			
500							470	460			
YR-(GACA)₃	4072	4072	4072	2036	4072	4072	4072	4072	6108	4072	
	2757	2757	2036	1876	2757	2757	2757	2036	5090	3424	
	2036	2036	1796	1736	2036	2036	2036	1956	4072	2757	
	1796	1796	1552	1552	1736	1796	1956	1796	2884	2545	
	1552	1552	1435	1051	1636	1552	1796	1736	2757	1956	
	1435	1435	1318	909	1552	1318	1736	1636	2036	1796	
	1318	1318	909	777	1051	909	1636	1552	1956	1736	
	1051	1051			909		1552	1435	1796	1636	
	909	987			777		1435	909	1736	1552	
		909					909	777	1636	1435	
							777		1552	777	
(GACAC)₂	1464	2332	4072	2036	2672	2332	2036	2036	2036	6108	
	778	2036	3393	1736	2036	2036	1736	1736	1736	5090	
	450	1736	2036	1464	842	1736	1464	1464	1464	3054	
		1464	1736	1361	730	1464	1361	1361	1361	2036	
		1361	1464	730		1361	730	730		1464	
		1293	1361			1189				1361	
		730	1189			730				730	
		538	730			538					
			538								

Cuadro 11A. Continuación...

(GACAC)₂-AG	6108	6108	6108	4072	6108	6108	4072	4072	4072	4072
	4072	2036	4072	3054	2036	4072	2757	3054	2757	2757
	2036	1519	2036	2757		1845	2375	2757	2375	2375
	1636	1302	1636	2375		1636	1845	2375	1845	1845
	1519	1168	1519	2036		1302	1302	1845	1636	1636
	1302	795	1302	1845		1168	1168	1636	1302	1302
	1168		1168	1636		1018	1018	1302	1168	1168
	1018		795	1519		795	795	1168	795	795
	795			1302				795		
				1168						
			795							
(GACA)₂-CT	2872	2872	3054	3054	6108	2872	2872	6108	2872	6108
	2654	2654	2872	2872	5090	2654	2435	3054	2435	2872
	2108	2108	2654	2108	4072	2435	2036	2872	2108	2435
	1836	1836	1836	2036	2872	2036	1736	2435	2036	2108
	1574	1736	1736	1736	1836	1836	1574	2108	1736	2036
	1481	1574	1574	1574	1736	1574	1481	2036	1574	1574
	1080	1481	1481	1481	1574	1481	824	1736	1481	1481
	700	1080	914	824	1481	1280		1574	824	824
		700				914		1481		
						700		824		
(GACAC)₃	1969	1969	4072	4072	4072	2457	2492	2667	2492	5090
	1869	1869	3054	2492	2667	2281	1969	2492	2281	3054
	1736	1736	2913	2281	2492	1969	1869	2281	1969	2913
	1636	1636	2808	1969	2457	1869	1736	1969	1869	2667
	1567	1567	2457	1869	1969	1736	1636	1869	1736	2457
	1464	1378	1969	1736	1869	1636	1567	1736	1636	2071
	1258	1258	1869	1258	1736	1567	1464	1378	1567	1378
	1086	1086	1736	1086	1636	1258	1378	1258	1464	1258
	983		1636		1567	1086	1258	1086	1378	1086
	803		1567		1258		1086		1258	
				1086				1086		
				983						
				803						
(CT)8-TC	5090	2278	5090	3393	1825	2278	3393	2278	2278	3393
	2278	1825	1825	2278	1636	1825	2278	1825	1825	2278
	1636	1636	1636	1825		1636	1825	1636	1636	1825
			1636				1636			1636
CAA-(GA)₅	806	806	806	806	806	806	806	1242	806	806
	683	683	683	683	683	683	683	1018	683	683
	550	550	550	550	550	550	550	806	550	550
	500	500	493	478	487	493	478	683	478	478
					472			550		
							478			