



**Universidad Autónoma Chapingo**

Departamento de Fitotecnia

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola



**RESPUESTAS MORFOGÉNICAS  
*in vitro* Y DIVERSIDAD  
GENÉTICA EN CUATRO RAZAS  
DE CACAHUATE (*Arachis  
hypogaea L.*)**



DIRECCION GENERAL ACADEMICA  
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES  
ORIGINA DE EXAMENES PROFESIONALES

**PRESENTA**

María Teresa Oliveros González

Como requisito parcial para obtener el  
grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

Chapingo, Méx. Abril, 2013

La presente tesis titulada: **EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y CULTIVO *in vitro* DE CUATRO RAZAS DE CACAHUATE (*Arachis hypogaea* L.)**, realizada por la **C. MARÍA TERESA OLIVEROS GONZÁLEZ**, bajo la dirección del consejo particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS  
EN BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA**

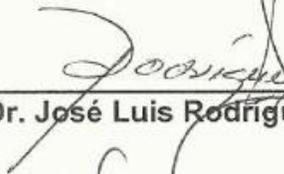
**CONSEJO PARTICULAR**

**DIRECTOR:**



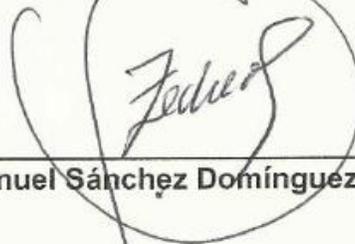
\_\_\_\_\_  
**Dr. Juan Porfirio Legaria Solano**

**ASESOR:**



\_\_\_\_\_  
**Dr. José Luis Rodríguez de la O**

**ASESOR:**



\_\_\_\_\_  
**Dr. Samuel Sánchez Domínguez**

Chapingo, Estado de México, Abril de 2013

# Dedicatorias

*A mi madre Sta. Teresita González Sánchez por motivarme a continuar con mis estudios y aprendizajes.*

*Por ser un claro ejemplo de superación y lucha para lograr las metas planteadas en la vida, siempre demostrando que nunca hay que darse por vencidos, y que el esfuerzo y la fe hacen que todo sea posible.*

*Gracias por toda una vida de sacrificios y enseñanzas, por sus consejos, regaños, sugerencias y palabras de aliento.*

*Por estar conmigo en todo momento, por disfrutar conmigo mis logros y también por animarme en los momentos de fracaso.*

*Gracias por haber asumido el papel tan difícil de ser madre y por dar día a día el ejemplo de la lucha verdadera.*

*Pero sobre todo gracias por confiar en mí y por brindarme la oportunidad de intentar y lograr superar mis metas.*

*Gracias por ser mi madre...*

*Con admiración y respeto, para usted.*

# Agradecimientos

*A Dios por vivir y poder disfrutar la satisfacción de culminar las metas fijadas.*

*A la Universidad Autónoma Chapingo por darme la oportunidad de desarrollarme profesionalmente, por ser más que una casa de estudios un hogar, fuente inagotable de conocimientos y experiencias, gracias por el apoyo brindado y por ser el camino a la educación y a una preparación continua.*

*A la Departamento de Fitotecnia por los conocimientos recibidos y la posibilidad de especializarme en esta forma de vida que es la Agricultura.*

*A Consejo Nacional de la Ciencia y la Tecnología (Conacyt) por los múltiples apoyos otorgados.*

*A la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola, por haberme permitido continuar formándome en sus aulas, por ser uno más de sus egresados, por la oportunidad de ampliar y especializar mis conocimientos, al tiempo que descubrí un área emocionante de continuos avances científicos y tecnológicos.*

*A Dr. Juan Porfirio Legaria Solano por su dirección y apoyo incondicional en la realización de este experimento, por sus conocimientos, paciencia, experiencia, sugerencias y consejos. Por demostrar que la ciencia es el producto de aciertos derivados de errores anteriores y que la constancia y la responsabilidad permiten alcanzar los objetivos deseados. Con sinceridad Gracias.*

*A Dr. José Luis Rodríguez de la O por su apoyo para llevar a cabo este proyecto, por sus sugerencias y recomendaciones para la mejora del trabajo presentado.*

*A Dr. Samuel Sánchez Domínguez por aportar su colecta de *Arachis hypogaea* L. y facilitar con ello el planteamiento de este proyecto de investigación, por sus consejos, apoyo y sugerencias.*

*A mis maestros por contribuir en mi formación y por compartir clase tras clase sus conocimientos y experiencias, con especial dedicación a la profesora Gloria Virginia Cano García por su constante impulso de superación, por ser maestra y amiga.*

*A mi madre Teresita, mis hermanos Maribel y Candido, mis abuelos, tíos y primos por cada una de sus palabras de aliento y su motivación constante. Por su importante apoyo brindado...gracias.*

*A mis amigos Lupita, Martha, Araceli, María, José Manuel, Violeta, Alfredo y Mareos por hacer nacer en la Maestría una etapa inolvidable de momentos divertidos y de recuerdos increíbles, por dar inicio a esta amistad, por compartir tantos momentos y reír de tantas cosas. Gracias por sus consejos, sus chistes y regaños, por compartirme sus alegrías y tristezas y por escuchar las mías... gracias, los quiero.*

*A la familia Flores Monterrosas gracias por su apoyo, ejemplo, consejos y experiencias, por el cariño recibido y por formar ya parte de mi vida.*

*A Heri, gracias por tu ejemplo de profesionalismo, por hacerme comprender que si amas lo que haces siempre resultará bien, por enseñarme que los errores se llaman así, porque así lo quieres, pero en realidad son aprendizajes. Por ser incondicional, por tus retos, consejos, sugerencias, por tu ayuda, soporte y amistad, por tu amor.....Gracias.*

# Datos Biográficos

María Teresa Oliveros González, nació en la localidad de Tlayecac, en el municipio de Ayala, Morelos, el 1 de Agosto de 1988. Ingresó a la Universidad Autónoma Chapingo para realizar sus estudios de Preparatoria y Licenciatura, esta última en la carrera de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia, egresando en el año 2010 con destacado desempeño académico obteniendo una titulación por Mérito Académico. En el año 2011 ingresó a la Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola de esta misma casa de Estudios. A la par obtuvo la Acreditación como Prestador de Servicios Profesionales (PSP) en Diseño de proyectos por parte de SAGARPA y la Certificación como Profesional en Sistemas de Reducción de Riesgos de Contaminación (SRRC) en la producción de Alimentos de Origen Agrícola otorgada por SENASICA, colaboró activamente en asesoría técnica en el área de inocuidad agroalimentaria y a la fecha se ha instruido en caracterización genética, estudios de diversidad y manejo de cultivo *in vitro*.

**EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA Y CULTIVO *in vitro* DE CUATRO RAZAS DE CACAHUATE (*Arachis hypogaea* L.)**

**EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY AND *in vitro* CULTURE OF FOUR RACES OF PEANUT (*Arachis hypogaea* L.)**

**María Teresa Oliveros González<sup>1</sup>, Juan P. Legaria Solano<sup>2</sup>**

**RESUMEN**

La especie *Arachis hypogaea* L. es una oleaginosa de importancia mundial que posee una amplia variabilidad genética poco estudiada y con gran potencial de uso en programas de conservación y fitomejoramiento. En el presente estudio se evaluaron 12 variedades de *A. hypogaea* L., provenientes de cuatro razas de cacahuate cultivadas en México. El objetivo fue evaluar la diversidad genética (intra e interpoblacional) presente en esta colecta, utilizando marcadores morfológicos y moleculares tipo RAPD e ISSR. Además de realizar una evaluación *in vitro* para establecer un protocolo de regeneración. Los resultados indican que los marcadores moleculares discriminan mejor que los morfológicos a los genotipos evaluados, al igual que los ISSR los agruparon mejor que los RAPDs. Las razas más relacionadas fueron *A. hypogaea* raza Español y *A. hypogaea* raza Valencia, mientras que las variedades con mayor diversidad genética fueron *A. hypogaea* 'NC17-UACH', *A. hypogaea* 'Criollo de Ocozocuautila' y *A. hypogaea* 'Rojo de Huazulco'. También, un 53.5 % de la variabilidad genética observada es posible atribuirla a diferencias dentro de las poblaciones y el resto (46.5 %) se debe a diferencias entre ellas. Por otro lado, la investigación *in vitro* reveló que las mejores respuestas morfogénicas se obtuvieron con los explantes yema y hoja, con las variedades 'Rojo de Huazulco' (raza Valencia) y 'Tersal' (raza Español) y con las concentraciones hormonales de 4 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D y 2.5 mgL<sup>-1</sup> BA para formación de callos y la regeneración de brotes, respectivamente.

**Palabras Clave:** Diversidad genética, *Arachis hypogaea* L., caracterización, marcadores moleculares, cultivo *in vitro*, respuestas morfogénicas.

**ABSTRACT**

*Arachis hypogaea* L. specie is a global important oilseed that has extensive genetic variability that has not been studied in depth, with great potential for use in conservation programs and plant breeding. In the present study, we evaluated 12 varieties of *Arachis hypogaea* L., from four races of peanut grown in Mexico. The objective was to assess the genetic diversity (intra and inter-population) in this collection, using morphological and molecular markers RAPD and ISSR. In addition, an assessment to establish an *in vitro* regeneration protocol, was conducted. The results indicated that the molecular markers discriminate in a better way than the morphological markers, and the pooled ISSR+RAPDs were better than the individual markers. The most related genotypes were *A. hypogaea* 'Spanish' race and *A. hypogaea* 'Valencia' race, while varieties with greater genetic diversity were *A. hypogaea* 'NC17-UACH', *A. hypogaea* 'Ocozocuautila landrace' and *A. hypogaea* 'Red Huazulco'. A 53.5 % of the observed genetic variability may be attributed to differences within populations and the rest (46.5 %) is due to differences between them. Furthermore, the *in vitro* research revealed that the best morphogenic responses were obtained with bud and leaf explants, with the varieties 'Red Huazulco' ('Valencia' race) and 'Tersal' (race 'Spanish') and hormonal concentrations of 4 mgL<sup>-1</sup>, 2,4-D and 2.5 mgL<sup>-1</sup> BA for callus formation and regeneration of shoots, respectively.

**Keywords:** Genetic diversity, *Arachis hypogaea* L., characterization, molecular markers, *in vitro* culture, morphogenic responses.

---

<sup>1</sup>Tesista

<sup>2</sup>Director

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>VI</b>
<b>ÍNDICE DE CUADROS</b> .....	<b>X</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>XII</b>
<b>ABREVIATURAS USADAS</b> .....	<b>XIV</b>
<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>II. OBJETIVOS GENERALES</b> .....	<b>4</b>
<b>III. HIPÓTESIS</b> .....	<b>4</b>
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	<b>5</b>
4.1 DESCRIPCIÓN DE <i>ARACHIS HYPOGAEA</i> L.....	5
4.2 CARACTERÍSTICAS BROMATOLÓGICAS DEL CACAHUATE .....	8
4.3 CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE TEJIDOS VEGETALES .....	8
4.4 INVESTIGACIONES DE CULTIVO <i>IN VITRO</i> EN CACAHUATE .....	11
4.5 DIVERSIDAD GENÉTICA .....	12
4.6 MARCADORES GENÉTICOS .....	13
4.6.1 Marcadores Morfológicos .....	14
4.6.2 Marcadores Bioquímicos .....	15
4.6.3 Marcadores Moleculares .....	16
4.6.4 Técnicas para Realizar Marcadores Moleculares.....	18

4.7 ESTUDIOS PREVIOS EN CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE <i>ARACHIS HYPOGAEA</i> L. .....	22
<b>V. METODOLOGÍA GENERAL.....</b>	<b>23</b>
<b>VI. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES.....</b>	<b>24</b>
6.1 INTRODUCCIÓN.....	24
6.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	25
6.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	25
6.3.1 <i>Caracterización Morfológica</i> .....	25
6.3.2 <i>Caracterización Molecular</i> .....	32
6.3.3 <i>Caracterización Morfológica Vs Molecular</i> .....	37
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	38
6.4.1 <i>Caracterización Morfológica</i> .....	38
6.4.2 <i>Caracterización Molecular</i> .....	45
6.4.3 <i>Caracterización Morfológica Vs Molecular</i> .....	56
6.5 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	60
<b>VII. ETAPA 2: DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES.....</b>	<b>61</b>
7.1 INTRODUCCIÓN.....	61
7.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	62
7.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	62
7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	63
7.5 CONCLUSIONES PARTICULARES.....	70

<b>VIII. ETAPA 3: RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN CULTIVO <i>IN VITRO</i>.</b>	<b>71</b>
8.1 INTRODUCCIÓN.....	71
8.2 OBJETIVOS PARTICULARES .....	72
8.3 MATERIALES Y MÉTODOS .....	73
<i>Proceso de Desinfestación de Explantes</i> .....	73
<i>Fase de Inducción de Callos</i> .....	75
<i>Fase de Regeneración de Brotes</i> .....	76
<i>Análisis Estadístico de los Datos</i> .....	76
8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	77
<i>Proceso de Desinfestación de Explantes</i> .....	77
<i>Inducción de Callos</i> .....	77
<i>Regeneración de Brotes</i> .....	81
8.5 CONCLUSIONES PARTICULARES .....	83
<b>IX. CONCLUSIONES GENERALES .....</b>	<b>84</b>
<b>X. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>85</b>
<b>XI. ANEXOS .....</b>	<b>94</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Clasificación taxonómica de cacahuate por Salas (1985).....	5
Cuadro 2. Subespecies y variedades de <i>Arachis hypogaea</i> L.....	6
Cuadro 3. Composición química promedio de la semilla de <i>Arachis</i> . ....	8
Cuadro 4. Características de los marcadores genéticos.....	14
Cuadro 5. Variedades de <i>Arachis hypogaea</i> L. utilizadas, su origen, datos de colecta y tipo de estudio realizado. ....	26
Cuadro 6. Descriptores utilizados para la caracterización morfológica de cacahuate ( <i>A. hypogaea</i> L.).....	28
Cuadro 7. Componentes y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR....	35
Cuadro 8. Medias y desviaciones estándar de las variables seleccionadas....	39
Cuadro 9. Matriz de correlación de las variables morfológicas.....	41
Cuadro 10. Componentes, eigenvalores y porcentajes individuales y acumulados del análisis de componentes principales. ....	43
Cuadro 11. Contribución de las variables en los componentes principales 1, 2, 3 y 4.....	44
Cuadro 12. Iniciadores seleccionados para la caracterización de variedades..	47
Cuadro 13. Valores de correlación obtenidos con la prueba de Mantel.....	57
Cuadro 14. Iniciadores seleccionados para el análisis de poblaciones. ....	63
Cuadro 15. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y valores de distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para las 12 poblaciones de cacahuate. ....	66

Cuadro 16. Variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de <i>Arachis</i> , con base en los patrones RAPD e ISSR. ....	67
Cuadro 17. Materiales de cacahuate utilizados en la evaluación morfogénica de <i>A. hypogaea</i> .....	73
Cuadro 18a. Tratamientos para la inducción de callos establecidos en los ensayos 1 y 2.....	75
Cuadro 18b. Tratamientos para la regeneración de brotes establecidos en los ensayos 3 y 4.....	76
Cuadro 19 Niveles de significancia en la influencia de diferentes explantes, cultivares y concentraciones de 2,4-D en la inducción de callos de <i>A. hypogaea</i> L. cultivados <i>in vitro</i> . ....	78
Cuadro 20. Efecto de diferentes tipos de explantes, cultivares y concentraciones de 2,4-D en las características de callos de <i>A. hypogaea</i> L. cultivados <i>in vitro</i> . 79	
Cuadro 21. Efecto de 2,4-D en la inducción de callos en cuatro genotipos de <i>Arachis</i> .....	80
Cuadro 22. Niveles de significancia en la influencia de diferentes explantes, cultivares y concentraciones de BA en la regeneración de brotes de <i>A. hypogaea</i> L. cultivados <i>in vitro</i> .....	81
Cuadro 23. Respuesta de BA en callogénesis y brotación, en accesiones de las razas Español y Valencia.....	82

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Establecimiento del experimento. ....	26
Figura 2. Etapas del desarrollo del cacahuate ( <i>Arachis hypogaea</i> L.).....	27
Figura 3. A) Ilustra la forma de medir altura de planta y B) Selección de hojas y medición de área foliar.....	29
Figura 4. Parámetro de hoja considerado para el conteo del número de hojas/planta (A) y Gradiente de colores para determinar el color de hoja (B)...	30
Figura 5. Medición de color de semilla con colorímetro. ....	30
Figura 6. A) Peso de semillas, B) Largo de semillas y C) Ancho de semillas. .	31
Figura 7. Variabilidad de semillas de cacahuate.....	38
Figura 8. Gráficas de crecimiento por planta de A) No. de Hojas, B) Área foliar y C) Altura.....	40
Figura 9. Dendrograma morfológico remuestreado. ....	43
Figura 10. Electroforesis de gel de calidad de ADN.....	45
Figura 11. Ejemplo de prueba de iniciadores tipo ISSR.....	46
Figura 12. Patrones de bandeo RAPDs de los genotipos de <i>Arachis</i> evaluados con los iniciadores A09, A17, A19 y A20, utilizados en el análisis de variedades. ....	48
Figura 13. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de <i>Arachis</i> evaluados con los iniciadores A1, A2, I3 e I4, utilizados en el análisis de variedades.....	49
Figura 14. Formación de grupos de genotipos de <i>Arachis hypogaea</i> L. usando marcadores: A) RAPDs, B) ISSR y C) Consenso (RAPD+ISSR). ....	51

Figura 15. Gráfica en 3D mostrando la distribución de grupos de los genotipos de <i>Arachis</i> utilizando datos de: A) RAPD, B) ISSR y C) RAPD+ISSR.....	52
Figura 16. Dendrogramas remuestreados generados a partir de datos de marcadores moleculares: A) RAPDs, B) ISSR y C) Consenso (RAPD+ISSR).	55
Figura 17. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: RAPD, ISSR, Consenso y Morfológico+RAPD+ISSR.....	58
Figura 18. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: RAPD, ISSR, Consenso y Morfológico+RAPD+ISSR.....	59
Figura 19. Patrones de bandeo RAPD de los genotipos de <i>Arachis</i> evaluados con el iniciador D05, para el análisis de poblaciones.....	64
Figura 20. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de <i>Arachis</i> evaluados con el iniciador A1, para el análisis de poblaciones.....	65
Figura 21. Dendrograma obtenido con la matriz poblacional.....	69
Figura 22. A) Variabilidad de semillas utilizadas, B) Proceso de desinfección de semilla y C) Crecimiento y desarrollo de plantas sanas bajo cultivo <i>in vitro</i> . ....	74
Figura 23. Formación de callo de <i>A. hypogaea</i> L. en: A) Hoja, B) Tallo, C) Yema y D) Cotiledón.....	80
Figura 24. Regeneración de brotes en <i>Arachis hypogaea</i> L. utilizando el explante yema a una concentración de 2.5 mgL <sup>-1</sup> de BA.....	81

## ABREVIATURAS USADAS

### Medidas/ Dimensiones

- °C: Grados centígrados
- ha: Hectárea
- h: Hora
- Kg: Kilogramo
- mg: Miligramo
- kb: Kilobase
- L: Litro
- M: Molar
- min: Minutos
- seg: Segundos
- mM: Milimolar
- $\mu$ M: Micromolar
- pM: Picomolar
- $\mu$ L: Microlitro
- rpm: Revoluciones por Minuto

### Compuestos / Sustancias

- MS: Medio de cultivo formulado con sales inorgánicas Murashige y Skoog (1962).
- BAP: Benciladenina o 6- Bencilaminopurina
- 2,4-D: Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
- NAA ó ANA:  $\alpha$ -Ácido Naftalenacético
- IAA ó AIA: Ácido Indolacético
- IBA: Ácido Indolbutirico

## I. INTRODUCCIÓN

La diversidad genética de las plantas generada durante la evolución, hibridación, selección natural y manipulación humana proporcionan la base para la producción mundial de alimentos. Esta diversidad es amenazada por la pérdida de su hábitat, el desarrollo y crecimiento de la población humana, y otros factores; por lo que su conservación adquiere cada vez mayor importancia a nivel mundial y demanda preocupación por mantener el mayor número de especies conservadas no solo en su centro de origen, sino también en aquellos lugares donde su uso tiene importancia o potencial (Castillo, 1996).

El principal objetivo de conservar germoplasma es dar un uso adecuado y oportuno al material genético conservado, para tal propósito es necesaria la correcta clasificación y caracterización de los individuos (Tapia, 2007), en donde se consideren el registro de rasgos morfológicos y moleculares altamente heredables para taxonomía, genética y otros propósitos de manejo (Breeding y Widrechner, 1995; Castillo, 1996).

El mejoramiento genético es un proceso a largo plazo, sobre todo con el uso de las metodologías tradicionales, por lo que es necesario recurrir al apoyo de las nuevas técnicas desarrolladas en biología molecular y biotecnología basadas en el uso del material genético o ADN para la identificación de poblaciones de interés. La información genética que posee cada individuo es determinada por su genotipo y se refiere a la totalidad de su información genética o parte de ella (Bergmann *et al.*, 1989). Los marcadores genéticos se utilizan en la investigación vegetal básica, en mejoramiento, caracterización y conservación;

etiquetado de genes; introgresión asistida de alelos favorables y protección de variedades comerciales (Henry, 2001).

La distribución y ocurrencia natural del género *Arachis* está confinada en aquella área de Sudamérica limitada por el río Amazonas en el norte, el río de la Plata en el Sur, por el Océano Atlántico en el este y por las faldas de los Andes en el oeste, aunque la distribución del género puede llegar a ser amplia. La mayor diversidad ocurre en la región de Matto Grosso, Brasil. Esta región se considera como el centro de origen del género (Sánchez, 1992).

Actualmente, el cacahuate es reconocido como un cultivo leguminoso importante a lo largo de América, África y Asia, donde es cultivado para su consumo local y comercio internacional, como alimento o como producto oleaginoso (Tombs, 1963, citado por Jayashree *et al.*, 2005).

En el mundo se cultivan alrededor de 24.01 millones de ha, siendo China, India, Nigeria, Estados Unidos y Senegal los principales países productores (FAO, 2010), mientras que en México se siembran 63,970.53 ha, concentrando el 80.48 % de su producción en los estados de Sinaloa, Puebla, Oaxaca, Chiapas y Chihuahua (SIAP, 2011).

En México, el mejoramiento genético de cacahuate se ha dirigido a obtener mayores rendimientos de este cultivo, basándose en caracterizaciones morfológicas (Martínez, 1999) y evaluaciones agronómicas para conocer su respuesta a condiciones ambientales (Orihuela, 1998). En contra parte, países como Estados Unidos, Chile, Brasil y Egipto se han enfocado a estudios más especializados como la diversidad genética morfológica (Marques, 2007), la diversidad genética molecular (Cuc *et al.*, 2008), el análisis de secuencias

genómicas (Jayashree *et al.*, 2005), mapeo del genoma (Varshney, 2009), caracterización de mutantes y la asociación de marcadores moleculares relacionados con resistencia a enfermedades (Azzam, 2007), así como el establecimiento de protocolos de regeneración en cultivo *in vitro* (Cucco, 2000). Ante este panorama y considerando la fuerte competencia que tienen los cacahuates mexicanos en el mercado internacional, así como su potencial para cultivarse en condiciones de sequia y temperaturas elevadas, se hace necesario el estudio de la variabilidad genética presente en los materiales cultivados en nuestro país, a fin de utilizar esta información para el planteamiento y desarrollo de programas de fitomejoramiento que permitan la obtención de variedades comerciales competitivas, de alto impacto y mejor calidad.

## II. OBJETIVOS GENERALES

- 🥜 Evaluar la diversidad presente en 12 accesiones de cuatro razas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), utilizando marcadores tipo RAPD's, ISSR y morfológicos.
- 🥜 Determinar las respuestas morfogénicas en cultivo *in vitro* para algunos materiales de *A. hypogaea* L.

## III. HIPÓTESIS

- 🌱 Ho: No se manifiestan respuestas morfogénicas *in vitro*, ni existe variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de las cuatro razas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) estudiadas.
- 🌱 Ha: Es posible detectar respuestas morfogénicas *in vitro* y variabilidad genética dentro y entre las poblaciones de las cuatro razas de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) estudiadas.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Descripción de *Arachis hypogaea* L.

El cacahuate cultivado fue clasificado por Linneo en 1753 y pertenece a la familia de las Fabaceae, al género *Arachis* y la especie *hypogaea* (Cuadro 1). Krapovickas y Gregory (1994) citados por Patte y Stalker (1995), clasificaron a *A. hypogaea* por regiones geográficas definiendo dos subespecies y seis variedades o razas botánicas (Cuadro 2).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de cacahuate por Salas (1985).

Reino	Plantae
Subreino	Embriophyta
División	Anthophyta
Subdivisión	Angiospermae
Clase	Dicotiledoneas
Subclase	Arquiclámideas
Orden	Rosales
Suborden	Rosineas
Familia	Fabaceae
Subfamilia	Papilonoideae
Tribu	Aeschynomeneae
Subtribu	Stylosanthinae
Género	<i>Arachis</i>
Especie	<i>hypogaea</i>

Según Krapovickas y Gregory, se reconocen seis centros de diversificación secundaria:

- a) Región Guaraní. Incluye las riveras de los ríos Paraguay y Paraná. Esta región es rica en la subespecie *fastigiata*, con presencia de las formas tipos “Spanish” y “Valencia”; las formas de la subespecie *hypogaea* se encuentran en menos cantidad.

Cuadro 2. Subespecies y variedades de *Arachis hypogaea* L.

Variedad Botánica	Tipo	Localización	Características
<b>S u b e s p e c i e                    h y p o g a e a</b>			
<i>Hypogaea</i>		Bolivia, Amazonas	Yemas no florales en el tallo principal, pares alternados de yemas no florales y reproductivas en las ramas, ramas cortas, menos pubescentes.
	Virginia		Plantas rastreras o erectas, Menos pubescente.
	Rastrero (Runners)		Menos pubescente, fruto y semilla pequeños.
<i>Hirsuta</i>	Peruano Rastrero	Perú	Más pubescente, frutos muy corrugados con semillas color púrpura o morado
<b>S u b e s p e c i e                    f a s t i g i a t a</b>			
<i>Fastigiata</i>	Valencia		Yemas florales en el tallo principal, secuenciación de pares de flores y yemas reproductivas en las ramas.
<i>Vulgaris</i>	Español	Brasil (Guadañan, Goias, Minas Gerais), Paraguay, Perú, Uruguay	Mayor ramificación, ramas curvas, erectas
<i>Peruviana</i>		Perú, Noroeste de Bolivia ( no existe en México)	Menos pubescente, vaina con reticulación profunda.
<i>Aequatoriana</i>		Ecuador (no existe en México)	Muy pubescente, con reticulación profunda de la vaina, tallos púrpura, más ramificado, erecto.

Fuente: Patte y Stalker, 1995.

- b) Sureste de Brasil (Goias y Minas Gerais). Comprende las riveras de los ríos Tocantín y Sao Rnecisco. Predominan las formas de la subespecie *fastigiata* y los tipos “Spanish”.
- c) Oeste de Brasil (Rondonia y noreste de Matto Grosso). Se encuentran en esta región los cacahuates de la especie *A. nambyquare* que ahora se consideran como una forma de *hypogaea* y unas pocas formas de *fastigiata* con cutículas amarillas.
- d) Bolivia (cuesta oriental de los Andes). La variedad botánica *hypogaea* y sus formas predominan en esta área, mostrando una gran variabilidad para varios caracteres morfológicos.
- e) Perú. En esta zona se localizan los cacahuates más primitivos del tipo “Valencia” (variedad *fastigiata*), caracterizados por frutos muy constreñidos y muy picudos y con pericarpios reticulados y muy gruesos.
- f) Noroeste de Brasil. En esta región existe una extensa variabilidad de la subespecie *fastigiata*. Las formas “Spanish” predominan, algunas de las cuales tienen semilla grande.

Investigaciones más recientes de Banks y Pietralli presentan siete centros de diversidad y el más reciente puede ser Ecuador, donde el material colectado se parece a las accesiones que han sido designadas como *A. hypogaea*, subespecie *fastigiata*, variedad *aequatoriana* (Krapovickas y Gregory, 1994).

## 4.2 Características Bromatológicas del Cacahuate

En nuestro país la semilla de cacahuate es consumida en diversas formas: tostada, salada o dulce, de manera directa o procesada. También se extrae su aceite para la elaboración de margarinas, la pasta tiene una enorme demanda para la preparación de alimentos balanceados por su alto contenido proteico (28- 30 %) y el alto contenido de aceites (50 % en promedio). Por lo anterior, es considerado entre las semillas más nutritivas y con un alto aporte de energía. Se reporta que en general el cacahuate tiene un contenido promedio de proteínas del 28.5 % y de lípidos 46.3 % en la almendra (Ochse, 1965). Las características bromatológicas de *Arachis* se muestran en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Composición química promedio de la semilla de *Arachis*.

CONCEPTO	% PESO SECO
Humedad	5.0
Proteína	28.5
Lípidos	46.3
Fibra cruda	2.8
Extracto Libre de Nitrógeno	13.3
Cenizas	2.9
Azúcares reducidos	0.2
Azúcares disacáridos	4.5
Almidón	4.0
Pentosas	2.5

Fuente: Ochse, 1965.

## 4.3 Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

Es una propagación artificial de tipo asexual de plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*, consiste en regenerar una planta a partir del cultivo de material vegetal, el cual, a su vez procede de tejido especializado (George *et al.*, 2008; Pérez, 2009 y Castillo, 2001). El cultivo de tejidos es un proceso por el que

piezas pequeñas de tejido vivo (explantes) se aíslan de una planta y se cultivan asépticamente por periodos indefinidos de tiempo en un medio nutritivo.

Este tipo de propagación es posible por la *totipotencialidad* de las células vegetales, es decir, la capacidad de desdiferenciarse y bajo condiciones controladas *in vitro*, regenerar una planta completa a partir de una célula aislada o un tejido vegetal. Todos los cultivos se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta ya sea tallo, hoja, raíz, yemas, primordios florales, anteras u otros (George *et al.*, 2008; Pérez, 2009; Castillo, 2001 y Mora, 2012). Para que el cultivo de tejidos sea exitoso es mejor iniciar con un explante rico en células indiferenciadas e indeterminadas; por ejemplo los del córtex o de tejido meristemático debido a que tales células son capaces de proliferar rápidamente.

En 1957 Skoog y Miller reportaron que el balance auxina- citocinina era muy importante para el crecimiento de las células en el cultivo. Con niveles relativamente altos de auxinas y niveles relativamente bajos de citocininas, ocurría el crecimiento indiferenciado de callo. Por el contrario, niveles relativamente altos de citocininas respecto a auxinas inducían la aparición de ramas diferenciadas. En 1962, Murashige y Skoog publicaron los detalles de un medio distinto con altos niveles de  $\text{NH}_4$ , medio que hasta la fecha ha sido utilizado con excelentes resultados en el cultivo de tejidos vegetales (Pierik, 1998; Castillo, 2001; Nunez *et al.*, 2006; Magallanes-Cedeño, 2004 y Mora, 2012).

La organogénesis es la capacidad de formar nuevos órganos vegetales a partir del explante como raíces y brotes adventicios, esta puede ser de dos tipos:

organogénesis directa y organogénesis indirecta. La organogénesis directa consiste en la formación de los órganos en el lugar del explante original, en la organogénesis indirecta se origina primero tejido calloso y a partir de éste se comienzan a originar los órganos (Pérez, 2009 y Olmos *et al.*, 2010).

La embriogénesis somática se define como la capacidad de algunas células para formar embriones en condiciones de cultivo *in vitro*. Al igual que en la organogénesis, existen dos tipos de embriogénesis somática *in vitro*, la directa (ESD) y la indirecta (ESI). La primera consiste en la aparición de los embriones en el explante original y en la segunda se requiere primero proporcionar al tejido las condiciones para inducir la formación de embriones, ya que este no presenta células proembriogénicas; para posteriormente cambiarlo a condiciones que sean propicias para la diferenciación de embriones. Por último, la multiplicación por yemas y ápices se basa en la formación de nuevos brotes a partir de meristemas, lo que no implica fenómenos de dediferenciación y rediferenciación como ocurre en las otras dos vías de multiplicación *in vitro* descritas anteriormente. Sin embargo, esta vía de cultivo *in vitro* resulta ser menos efectiva que las anteriores, ya que se produce sólo una planta por meristemo (Pérez, 2009 y Barbat, 2006).

El cultivo *in vitro* genera algunas ventajas, una de ellas es el hecho que esta técnica no sólo sirve para micropropagar un cultivo, sino que también proporciona saneamiento y mantenimiento de plantas libres de patógenos. Además, esta técnica es considerada como una técnica de clonación, es decir, se pueden propagar plantas élite con características específicas, las cuales al

ser propagadas tradicionalmente por otro método de multiplicación vegetativa o cruza clásicas, no permanecerían en la planta hija (Estopà, 2005).

#### **4.4 Investigaciones de Cultivo *in vitro* en Cacahuete**

Fontana y *et al.* (2009) realizaron un experimento para evaluar la organogénesis y regeneración del explante hoja en tres accesiones de cacahuete cultivadas en medio MS suplementado con diferentes concentraciones de ANA, IAA, BAP, kinetina y thidiazuron. Los mejores resultados para la regeneración de yemas se observaron en el medio adicionado con 13.62  $\mu\text{M}$  de thidiazuron y 4.44 de BAP, mientras que la elongación de estas yemas se obtuvo con 0.54  $\mu\text{M}$  de ANA, 13.95  $\mu\text{M}$  kinetina and 13.32  $\mu\text{M}$  BAP. Además, indicaron que el genotipo juega un rol importante en las respuestas morfogénicas y en los efectos órgano genéticos obtenidos.

En otro estudio, realizado por Tyagi *et al.* (1993) se empleó una variedad tipo Virginia, de la cual se tomaron como explantes cotiledones, hojas y embriones. Encontrando que la multiplicación de brotes se originó de nudos cotiledonales con 3.0 mg/L de BAP y 0.5 mg/L de IAA. Por su parte, Venkatachalam *et al.* (1996) evaluaron inducción a callos y morfogénesis en seis explantes (hipocotilo, epicotilo, yema axilar, nudo cotiledonal, hoja madura y embriones inmaduros), cultivados en medio MS adicionado con diferentes concentraciones de vitamina B5, y diferentes concentraciones de IAA, NAA, IBA y BAP. Sus resultados indican que las hijas maduras son los mejores explantes para formar callo, en contraparte, la mejor regeneración de brotes se llevó a cabo con nudos cotiledonales y en medio con 2.0 mg/L de IBA y 0.2 mg/L de kinetina.

#### 4.5 Diversidad Genética

La variabilidad genética o diversidad genética en sentido amplio es el componente más básico de la biodiversidad y se define como las variaciones heredables que ocurren en cada organismo, entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie (Piñero, 2008).

El enfoque de cuantificar la variación genética puede ser generalmente dividido en tres categorías basadas en: a) observaciones, b) suposición, c) similitud. Los enfoques basados en la observación son los métodos más simples de evaluación de la diversidad y proponen un valor único de la amplitud de la diversidad dentro de un grupo (ej. número de alelos) y son típicamente asociados con las medidas de riqueza alélica. Otras medidas son suposiciones del equilibrio de Hardy-Weinberg. Por lo tanto las desviaciones de Hardy-Weinberg pueden ser probadas. El uso principal de este enfoque consiste en determinar la cantidad total de diversidad genética dentro de una especie y su grado de compartimentación dentro y entre poblaciones. El enfoque de similitud (ej. índices de Simpson y Shannon) se basa en el grado de alelos compartidos en una población, se puede utilizar en una gama de métodos de marcadores moleculares y es comúnmente asociado con los análisis de datos dominantes. La similitud estadística mide el grado de parecido entre pares de poblaciones o especies (Lowe *et al.*, 2004).

La información sobre identificación, diversidad genética y relaciones entre cultivares es importante para la conservación eficiente, mejoramiento y

utilización de los recursos fitogenéticos. Previamente, esta información se ha obtenido usando marcadores morfológicos (Huamán *et al.*, 1977).

#### **4.6 Marcadores Genéticos**

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas (morfológicas) que los distinguen entre sí. Esta variabilidad o “polimorfismos” genéticos, ocurren en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre 2 individuos sirve entonces como una etiqueta o “marcador genético” que se convertirá en un rasgo característico propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos. Un marcador genético es una banda de ADN que puede estar asociada con un carácter agronómico si se habla de plantas y pueden ser morfológicos, moleculares o bioquímicos (Valadez y Kahl, 2005). Algunas de sus características se observan en el Cuadro 4.

Los marcadores son las características distintivas de un organismo o una población que se manifiestan de manera constante, aspecto en que se basa la selección de individuos deseables en el mejoramiento genético. Los aspectos ideales para un marcador son: a) polimorfismo, b) herencia mendeliana y no epistasis, c) insensibilidad a la influencia de factores ambientales, d) ausencia de efectos en el desarrollo de la planta, es decir, comportamiento neutro, e) simplicidad en la identificación y análisis, f) codominancia y, g) posibilidad de detección en las primeras fases del desarrollo de la planta (De Viene, 2003).

Los marcadores genéticos se utilizan en la investigación vegetal básica, en mejoramiento, caracterización y conservación; etiquetado de genes;

introgresión asistida de alelos favorables y protección de variedades comerciales (Henry, 2001).

Cuadro 4. Características de los marcadores genéticos.

Característica	Proteínas	Isoenzima	RFLP	RAPD	VNTR	AFLP	SSR
Polimorfismo	Alto	Bajo	Bajo-alto	Medio-alto	Medio-alto	Medio-alto	Alto
Estabilidad ambiental	Alta	Moderada	Alta	Alta	Alta	Alta	Alta
Número de <i>loci</i>	Bajo	Medio	Alto	Alto	Alto	Alto	Alto
Reproducibilidad	Alta	Moderada-alta	Alta	Moderada-alta	Alta	Alta	Alta
Aplicación	Rápida-barata	Rápida-barata	Lenta-cara	Rápida-cara	Intermedia	Lenta-cara	Lenta-cara

Fuente: Becerra y Paredes (2000).

RFLP: Fragmentos de restricción polimórficos, RAPD: Amplificación de ADN al azar, VNTR: Número variable de repeticiones en tándem, AFLP: Amplificación de fragmentos polimórficos, SSR: Secuencias simples repetidas.

#### 4.6.1 Marcadores Morfológicos

Los marcadores morfológicos son el primer indicador visible para la identificación y diferenciación de genotipos, aspecto que es cuidadosamente estudiado en el área del mejoramiento genético para la selección adecuada de vegetales y animales. Los rasgos morfológicos son los marcadores más antiguos y ampliamente usados y pueden ser óptimos para ciertas aplicaciones en el manejo de germoplasma. Su principal ventaja es la simplicidad, rapidez y bajo costo; sin embargo, su empleo es limitado debido a que suelen presentar dominancia, pleiotropía, epistasis e incluso algunos son deletéreos, además de que son limitados, complejos y fuertemente influenciados por el ambiente (Tapia, 2007).

#### **4.6.2 Marcadores Bioquímicos**

Los marcadores bioquímicos pueden estar representados por los metabolitos secundarios, proteínas estructurales, isoenzimas o enzimas (Valadez y Kahl, 2005), teniendo como principio el análisis mediante la separación de los polipéptidos por electroforesis (Bassini, 1976).

Las características principales de las isoenzimas incluyen la simplicidad, cantidad mínima de material en estudio, bajo costo y una cobertura del genoma de 10- 20 *loci* por especie, ausencia de epistasis y presencia de influencias ambientales, este aspecto es de vital importancia ya que estas proteínas pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales; por lo tanto, para eficientar la técnica deben ser identificados los estados de desarrollo de las plantas en las cuales la proteína sea estable (Becerra y Paredes, 2000). Los marcadores con isoenzimas se caracterizan por presentar expresión alélica de tipo codominante, lo que permite hacer comparaciones entre especies, poblaciones de una misma especie y detectar la presencia de híbridos e introgresión de genes (Paredes y Gepts, 1995).

Las limitaciones de los marcadores morfológicos y bioquímicos han sido superadas con la nueva generación de marcadores moleculares basados en las variaciones del ADN, ya que presentan la característica de no ser afectados por el ambiente y dependen directamente de las propiedades del ADN, las cuales no cambian aunque las plantas estén sujetas a condiciones ambientales cambiantes (Mendoza y Simpson, 1996).

### 4.6.3 Marcadores Moleculares

Los organismos vivos pueden revelar regiones con diferentes secuencias nucleotídicas (polimorfismos) que los hacen diferentes de otros individuos y funcionan como una huella genética y como marcador molecular, esta variabilidad o polimorfismos genéticos ocurren de manera natural entre y dentro de diferentes poblaciones de organismos (Trigiano y Caetano-Anolles, 1995). Estas diferencias son resultado de cambios o rearrreglos entre las bases que forman el ADN como translocaciones, inversiones, inserciones o deleciones en regiones homólogas. Estos marcadores, además tienen la ventaja de ser dominantes o codominantes y no son influenciados por el ambiente (Nieto *et al.*, 2005 y Valadez y Kahl, 2000). Las huellas genómicas (DNA fingerprinting) hacen referencia a la identidad genética de un organismo, y se representan por los perfiles de ADN obtenidos mediante electroforesis, aunado al peso molecular de cada una de las bandas (Valadez, 2006).

Los marcadores moleculares de ADN pueden agruparse en tres categorías, dependiendo el tipo de técnica que se utiliza para generarlos. La primera categoría se basa en la técnica de hibridación (Southern), cuyo propósito principal es explorar las variaciones en la longitud de los fragmentos de ADN ocasionados por la restricción del genoma con alguna endonucleasa particular. La segunda categoría agrupa las metodologías basadas en la tecnología de la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (Polymerase Chain Reaction). Esta tecnología utiliza secuencias de oligonucleótidos que inician la síntesis *in vitro* de fragmentos de ADN de longitudes variables no mayores de 6 kb en

promedio. Estas secuencias pueden ser aleatorias, semialeatorias o específicas. La tercera categoría involucra metodologías que combinan la PCR o sus productos de ADN más la hibridación tipo Southern. Por ejemplo la técnica de RAHM (Random Amplified Microsatellite Polymorphism) o llamada también RAMPO, que requiere de la síntesis previa de ADN con cualquiera de las metodologías de la PCR y la posterior hibridación con alguna sonda que detecte microsatelites, optimizando de esta manera la tipificación del ensayo, pues con el resultado de la PCR se detecta un patrón de fragmentos llamados de “primera generación” pero al hibridar las huellas con una sonda radioactiva que detecta microsatelites se revela otro patrón llamado de “segunda generación”(Valadez y Kahl, 2000).

Las propiedades deseables de los marcadores moleculares deben ser: a) fácil acceso a cientos de caracteres (a veces miles) en un corto periodo de tiempo, b) alto nivel de polimorfismo, c) herencia codominante, d) designación no ambigua de alelos, e) ocurrencia frecuente en el genoma, f) comportamiento neutral (no son influidos por el ambiente), g) ensayos rápidos y fáciles y, h) alta reproducibilidad (Valadez, 2006). Los marcadores moleculares representan variación genética permitiendo estimar parentesco entre diferentes genotipos y, consecuentemente, predecir cuáles apareamientos producirán nuevas y superiores combinaciones de genes. Los principales usos son la realización de mapas genómicos, análisis de germoplasma como nuevas fuentes de variación, identificación de genotipos, detección de híbridos y determinación de rangos de autocruzas, análisis de pedigrí, etiquetado de genes que controlan caracteres de importancia comercial, elaboración de mapas de *loci* con rasgos

cuantitativos, estudios de introgresión de genes, población genética y estudios taxonómicos y expansión del conocimiento sobre la estructura del genoma (Doyle y Doyle, 1990).

#### **4.6.4 Técnicas para Realizar Marcadores Moleculares**

##### **4.6.4.1 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)**

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es un proceso *in vitro* que permite amplificar secuencias de ADN de manera exponencial (Valadez y Kahl, 2005). Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas “primers”, cebadores o iniciadores, una enzima Taq ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxirribonucleósidos trifosfato (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar las temperaturas dependiendo del ciclaje programado (Valadez y Kahl, 2000). La PCR se realiza en tres pasos: el primero es una desnaturalización que sirve para separar la cadena doble de ADN en dos sencillas a alta temperatura (94° C); en el segundo, la temperatura se reduce para permitir el alineamiento de las moléculas iniciadoras o "primers" a la secuencia blanco o secuencia original del ADN; en el tercer paso se lleva a cabo la elongación o extensión (polimerización) de la molécula iniciadora, momento donde interviene la enzima Taq ADN polimerasa que anexa a esta molécula los desoxirribonucleótidos necesarios para formar la nueva cadena de ADN; esta enzima tolera hasta 72 °C de temperatura. Al término de dichos pasos se realiza un ciclo de amplificación. La reacción se realiza en un

termociclador, el cual es un incubador pre-programado que cicla automáticamente (Valadez y Kahl, 2005).

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 o diseñados para hibridar en dirección contraria. El método implica la ejecución de una serie repetitiva de ciclos, 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), llegando a obtener millones de copias que por cantidad es posible visualizar aun cuando la secuencia que se busca se encuentre en concentración muy baja (Saiki *et al.*, 1988). La cadena se duplica con respecto al ciclo previo; así, la concentración de moléculas de ADN de doble cadena colocadas inicialmente en el termociclador serán  $2^n$  moléculas, donde  $n$  = al número de ciclos realizados (Valadez y Kahl, 2005).

#### **4.6.4.2 Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar (RAPD)**

La modificación que les dio origen consistió en sustituir en la tecnología PCR, el uso de un par de iniciadores cuidadosamente diseñados y un poco largos, por un solo iniciador corto, de 10 nucleótidos de longitud y de secuencia arbitraria, con la capacidad de unirse a regiones específicas en el genoma (Waugh y Powell, 1992; Valadez y Kahl, 2000). En el análisis de PCR los dos iniciadores son usados para amplificar una secuencia específica del genoma, y

en el análisis de RAPD, el iniciador se usa para amplificar secuencias al azar de un patrón complejo de ADN (Phillips *et al.*, 1995; Azofeita, 2006).

La técnica RAPD es una amplificación enzimática diferencial de fragmentos pequeños de ADN, utiliza iniciadores arbitrarios o aleatorios, que usualmente tienen un contenido de GC (guanina y citocina), mayor a 50 %. Esos iniciadores no tienen secuencias repetidas inversas internas y se pegan a distintos sitios de un genoma, si es que existen diferentes sitios blanco para ellos. Esta unión es reconocida por la enzima Taq ADN polimerasa que inicia el alargamiento del iniciador a partir del extremo 3'; el alargamiento resultante produce una cadena de ADN, cuya secuencia de bases es complementaria a la cadena molde.

El producto de la amplificación se acumulará a un gran número de copias y puede ser visualizado mediante electroforesis después de teñirse el gel con bromuro de etidio. Una amplificación es exitosa, sólo si el sitio blanco para el iniciador está localizado en ambas cadenas del ADN molde en polaridad opuesta y a una distancia de 50-6000 pares de bases en promedio (Valadez y Kahl, 2005). En RAPDs 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). Usualmente esta técnica provee marcadores dominantes, ya que los polimorfismos se detectan mediante la presencia o ausencia de bandas (Valadez y Kahl, 2005), esto evita la identificación de los heterocigotos. La técnica es rápida, fácil de realizar, comparativamente barata, y se aplica a diferentes organismos, puesto que solamente se utilizan pequeñas cantidades de ácido nucleico (Valadez y Kahl, 2005).

Para la reproducibilidad de los patrones de RAPD es absolutamente necesario optimizar las concentraciones del ADN, cloruro de magnesio ( $MgCl_2$ ), iniciadores y dNTPs. También, la clase de polimerasa termoestable debe mantenerse constante durante la experimentación así como la utilización del mismo termociclador. Cualquier cambio en la polimerasa o en el termociclador, pueden afectar inevitablemente la reproducibilidad de los patrones. Una vez que todos los parámetros se conocen, los patrones de RAPD son reproducibles (Valadez y Kahl, 2005).

Según Valadez y Kahl (2000) los marcadores moleculares apoyan al mejoramiento genético de plantas mediante diversas formas. Los que están ligados a características de interés, pueden ser utilizados para seleccionar individuos segregantes en el estado de plántula. Esta es una estrategia especialmente utilizada, si la característica respectiva es difícil de seleccionar o cuando solamente se expresa en plantas maduras. Los marcadores ligados pueden también utilizarse para acelerar la introgresión de genes específicos, o de partes de cromosomas de especies relacionadas a las especies cultivadas por mejoramiento de retrocruzas.

#### ***4.6.4.3 Intersecuencias Simples Repetidas (ISSR)***

La técnica de ISSRs, también llamados inter microsatélites, utiliza iniciadores cuya secuencia debe estar formada por di- o trinucleótidos con un nucleótido extra en la terminación 3'. El iniciador es complementario a una región microsatelite blanco, y el nucleótido extra permite la amplificación solamente si el 'primer' se pega a la terminación 5' del microsatelite 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 microsatelite. En donde el cebador localiza dos regiones microsatelite 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 microsateletes (Bornet y Branchard, 2001). Los ISSR permiten detectar alta variación y son muy reproducibles, dado esto último principalmente por las altas temperaturas de alineación utilizadas durante la PCR. Además, para diseñar los ‘primers’ no es necesario conocer secuencias del genoma del organismo en estudio, por lo que se han utilizado ampliamente en estudios de variación genética entre individuos muy cercanos y en la identificación de variantes con importancia agrícola (Nagaoka y Ogihara, 1997).

#### **4.7 Estudios previos en caracterización genética de *Arachis hypogaea* L.**

Raina *et al.* (2001) reportan un estudio de diversidad genética, identificación varietal y relaciones filogenéticas, en 13 accesiones de cacahuates silvestres y cultivados, utilizando marcadores tipo RAPD e ISSR, y encontrando la formación de cuatro grupos correspondientes a las especies agrupadas en las cuatro secciones taxonómicas. Por su parte, De Carvalho *et al.* (2004) analizaron la diversidad genética de 60 accesiones de cacahuate cultivado y silvestre, basados en regiones hipervariables del genoma. La región de estudio fue el centro de Brasil y ciudades vecinas. Se probaron un total de 67 nuevos marcadores microsateletes, sin embargo solo tres fueron polimórficos para este

cultivo. Los resultados mostraron que la colección de germoplasma de cacahuate brasileño tiene considerables niveles de diversidad detectados por marcadores SSR.

Posteriormente, Freitas *et al.* (2007) evaluaron cacahuates de Brasil también mediante el uso de microsatélites detectando niveles altos de diversidad genética y grupos relacionados genéticamente bien diferenciados. Adicionalmente, Mondal *et al.* (2009) publicaron un estudio en el que 21 marcadores ISSR fueron usados para analizar la diversidad genética entre 20 genotipos de cacahuates cultivados, encontrando que de los 154 amplicones encontrados 115 fueron polimórficos.

Estos resultados indican que ha sido posible la detección de diversidad genética en colectas de *Arachis hypogaea* L., además de que los estudios realizados buscan desde la comprensión de su filogenética hasta la identificación de variedades elite que puedan ser empleadas en programas de fitomejoramiento del cacahuate cultivado.

## **V. METODOLOGÍA GENERAL**

Para lograr los objetivos planteados en esta investigación se procedió a dividir el trabajo en tres etapas: la primera consistió en la caracterización de variedades que incluye la evaluación morfológica, la molecular y la morfológica vs molecular; la segunda, fue el estudio de la diversidad genética dentro de las poblaciones empleando un estudio molecular, y la tercera y última, correspondió al análisis de las respuestas morfogénicas en cultivo *in vitro*. A continuación, se desarrolla ampliamente el contenido en cada una de estas etapas.

## VI. ETAPA 1: CARACTERIZACIÓN DE VARIEDADES

### 6.1 INTRODUCCIÓN

El cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) posee una amplia diversidad morfológica desde el hábito de mata (erectos), hasta los rastreros, con variaciones en otros caracteres morfológicos, como número de ramas vegetativas y reproductivas, y duración de la floración (Krapovickas y Gregory, 1994). Las variables de tipo cualitativo (color de tallo, hojas, flor, semilla, y otras), respecto a las de tipo cuantitativo, presentan diferente grado de interacción con el ambiente, debido a la herencia monogénica o digénica de unas (Wayne y Coffelt, 1982; Sánchez, 2006) y poligénica o cuantitativa de las otras (Márquez, 1985; Sánchez, 2006). Los caracteres hereditarios que interaccionan menos con el ambiente, y se consideran los más útiles para distinguir las diversas variedades de cacahuate son: tamaño y forma de vaina, número de semilla por fruto y color de tegumento seminal (Gillier y Silvestre, 1970; Sánchez, 2006). El agrupamiento de variedades de cacahuate se ha realizado con base en características de germinación (Huiquin *et al.*, 1997; Sánchez, 2006), análisis de pedigrí (Sánchez, 2006), contenido de ácidos grasos (Hartch *et al.*, 1995; Sánchez, 2006) y tolerancia a inundaciones (Kotzamanidis y Stavropoulus, 1988; Sánchez, 2006). Sin embargo, en recientes investigaciones se ha promovido el uso de marcadores moleculares para complementar y reforzar de manera más sólida los agrupamientos establecidos. Sánchez (2006) menciona que generar una clasificación para caracteres cuantitativos y otra para cualitativos ayuda a entender y complementar mejor una clasificación.

## 6.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 🌱 Conocer la variabilidad morfológica y molecular existente entre 12 accesiones de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.).
- 🌱 Comparar las agrupaciones de parentesco obtenidas mediante el empleo de marcadores tipo RAPD's, ISSR y morfológicos.

## 6.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.3.1 Caracterización Morfológica

#### ***Material vegetal y diseño del experimento***

En el presente estudio se evaluó una colección de 12 genotipos de cacahuate procedentes de cuatro razas diferentes (Cuadro 5). Ocho materiales fueron empleados para la caracterización morfológica y doce para la caracterización molecular.

El experimento se estableció en las instalaciones de la Universidad Autónoma Chapingo bajo condiciones de invernadero rustico con cubierta de cristal, en el periodo de otoño-invierno del 2011 y posteriormente en el Laboratorio de Biotecnología de la UACH. La Universidad se localiza en el Estado de México, entre las coordenadas 19° 29' 34.61" LN, 98° 53' 06.93" LO, a 2,254 msnm. La temperatura media oscila entre 22 y 28 °C, el clima se clasifica como C Wo w b (y) g (García, 1988).

El establecimiento del cultivo (Figura 1) y su desarrollo (Figura 2), permitió llevar a cabo el análisis morfológico. Para ello, se utilizó un diseño experimental

completamente al azar (DCA) con 5 repeticiones, 8 genotipos y un total de 40 individuos.

Cuadro 5. Variedades de *Arachis hypogaea* L. utilizadas, su origen, datos de colecta y tipo de estudio realizado.

Siglas	Variedad	Tipo de Raza	TC	Origen	AC	TE
Ts-Es	Tersal	Español	E	Edo. México	2010	Mr y MI
Rt-Va	Rojo de Tlaltenango	Valencia	E	Zacatecas	2011	Mr y MI
Rh-Va	Rojo de Huazulco	Valencia	E	Morelos	2010	Mr y MI
Ccu-Vr	Criollo de Cuauchichinola	Virginia	R	Morelos	2010	Mr y MI
Ch-Vr	Criollo de Huitzucu	Virginia	R	Guerrero	2010	Mr y MI
Gu1-Vr	De Guia 1	Virginia	R	Morelos	2011	MI
Gu2-Vr	De Guia 2	Virginia	R	Morelos	2011	MI
NC-Ve	NC17-UACH	Virginia	E	Morelos	2006	Mr y MI
Co-Ve	Criollo de Ocozocuaula	Virginia	E	Chiapas	2010	Mr y MI
CR-Ve	CROC10	Virginia	E	Morelos	2010	Mr y MI
Cch1-Hi	Criollo Chino1	Hirsuta	R	Puebla	2011	MI
Cch2-Hi	Criollo Chino 2	Hirsuta	R	Puebla	2011	MI

TC= tipo de crecimiento: E= erecto, R= rastrero. AC= Año de colecta. TE= Tipo de evaluación: Mr= Morfológica y MI= Molecular.



Figura 1. Establecimiento del experimento.



Figura 2. Etapas del desarrollo del cacahuate (*Arachis hypogaea* L.).

### **Variables evaluadas**

Las variables respuesta evaluadas fueron seleccionadas de los United States Peanut Descriptors (Pittman, 1995), enlistadas en el Cuadro 6.

Cuadro 6. Descriptores utilizados para la caracterización morfológica de cacahuete (*A. hypogaea* L.).

<b>Variable</b>	<b>Carácter medido</b>	<b>Unidad</b>	<b>Escala</b>
<b>AP</b>	Altura de planta	Centímetros	-
<b>AF</b>	Área foliar	Centímetros cuadrados	-
<b>NH</b>	No. de hojas	-	-
<b>CH</b>	Color de las hojas	-	-
<b>CSL</b>	Color de semilla luminosidad	-	UC
<b>CSC</b>	Color de semilla cromaticidad	-	UC
<b>PCS</b>	Peso de 100 semillas	Gramos	-
<b>LS</b>	Largo de semilla	Centímetros	-
<b>AS</b>	Ancho de semilla	Centímetros	-
<b>RALS</b>	Rel. ancho / largo de semilla	-	0-1

AP= Altura de planta, AF= Área foliar, NH= No. de hojas, CH= Color de las hojas, CSL= Color de semilla Luminosidad, CSC= Color de semilla Cromaticidad, PCS= Peso de 100 semillas, LS= Largo de semilla, AS= Ancho de semilla, RALS= Relación ancho/largo de semilla, No. =Número, Rel.= Relación, UC= Unidades color.

Las características estructurales evaluadas en la planta fueron:

- Altura de planta (AP): Ésta se midió desde la base del tallo hasta el meristemo apical, considerando la planta en su estado adulto y en etapa productiva; las mediciones se tomaron semanalmente (Figura 3).
- Área foliar (AF): Se tomó una muestra de dos hojas por planta, la hoja más joven y la más vieja, en tres individuos diferentes (repeticiones) por accesión y se obtuvo su valor de área foliar empleando un medidor de área foliar de laboratorio Modelo LI-3100, de Li-cor (Figura 3). Posteriormente, se obtuvieron promedios de las repeticiones para cada

uno de valores medidos en cada accesión y en seguida se aplicaron las siguientes formulas:

$$A_n = A_0 e^{Rn}$$

Donde:  $A_n$  es el área de la hoja  $n$ ,  $A_0$  es el área de la hoja inicial,  $R$  es la tasa relativa del área foliar que cuantifica el incremento en el área de una hoja a la siguiente.  $R$  se calcula de la manera siguiente:

$$R = (\ln A_n - \ln A_i) / (N - 1).$$

Donde:  $A_n$  es el área de la hoja más joven y  $A_i$  es el área de la hoja verde más vieja en la planta (Turner, 2003).

Finalmente, el valor de  $A_n$  se multiplicó por el número de hojas por planta y se obtuvo así un valor de Área Foliar por planta.

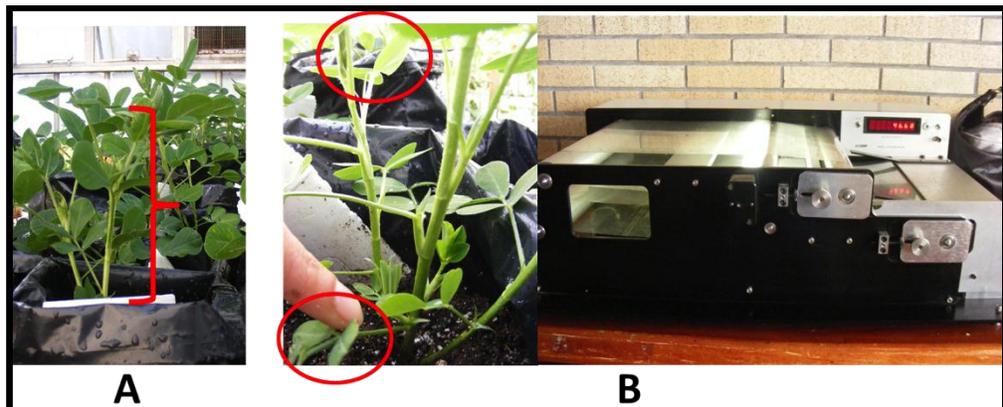


Figura 3. A) Ilustra la forma de medir altura de planta y B) Selección de hojas y medición de área foliar.

- Número de hojas (NH): Se contabilizaron todas las hojas maduras de la planta, esto es, aquellas que poseían la formación completa de los cuatro foliolulos, el pedicelo y cuya posición estaba extendida (Figura 4).
- Color de hojas (CH): Su medición se realizó con base a la escala de colores mostrada en la Figura 4.

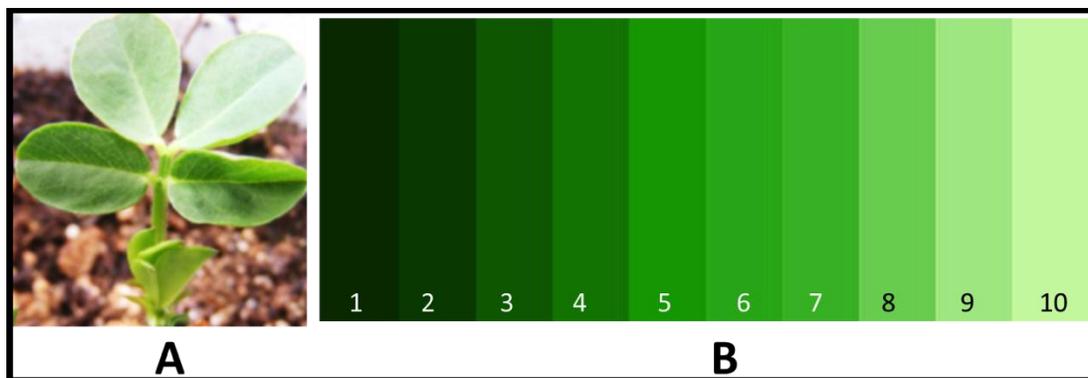


Figura 4. Parámetro de hoja considerado para el conteo del número de hojas/planta (A) y Gradiente de colores para determinar el color de hoja (B).

- Color de semillas (CS): Para la medición de este parámetro se utilizó un Colorímetro MiniScan XE PLUS, HunterLab, Serie No. 7312, Modelo 45/0-L USA (Figura 5), utilizando la escala Cielab. Las mediciones se realizaron registrando los valores de  $L^*$ ,  $a^*$  y  $b^*$ . La luminosidad se tomó como el valor de  $L^*$  y se calculó la pureza de color o cromaticidad  $\left(\sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}\right)$  (McGuire, 1992).

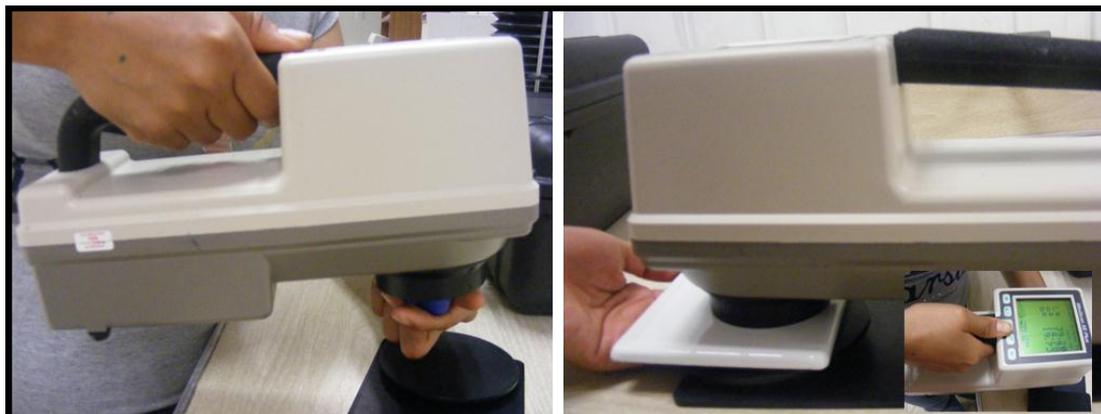


Figura 5. Medición de color de semilla con colorímetro.

- Peso de 100 semillas (PCS): Debido a la cantidad reducida de frutos por variedad se tomaron algunos y se obtuvo semilla, de estas se pesaron 10 en una balanza granataria Ohaus, modelo H-2382, y posteriormente, este dato se extrapoló a 100 semillas (Figura 6).
- Largo de semilla (LS): Se consideró como largo la medida correspondiente a los dos extremos en punta de la semilla, tal como se ilustra en la Figura 2, la medida se tomó con un Vernier (Figura 6).
- Ancho de semilla (AS): Se refiere a la medida media perpendicular a los extremos en punta de la semilla, también tomada con Vernier (Figura 6).
- Relación ancho/ largo de semilla (RALS): Resultó del valor obtenido de dividir el ancho de la semilla entre el largo de ésta.

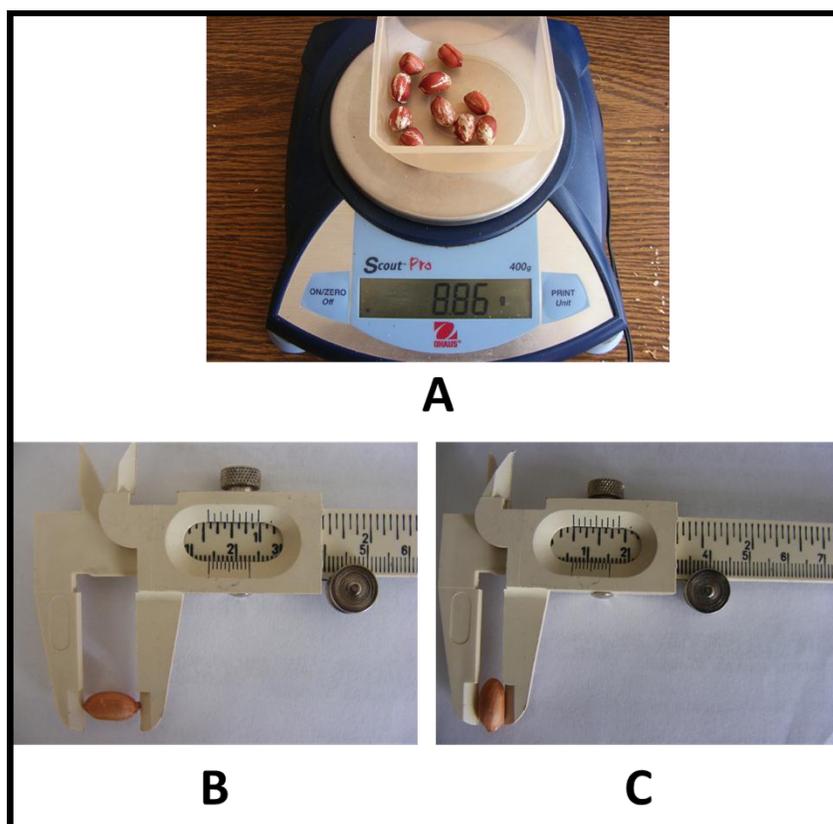


Figura 6. A) Peso de semillas, B) Largo de semillas y C) Ancho de semillas.

### ***Análisis estadístico de marcadores morfológicos***

Con el propósito de analizar estadísticamente los caracteres morfológicos evaluados, se realizó una base de datos en Excel. Con las variables morfológicas cuantitativas y cualitativas se hizo un análisis estadístico con el programa Statistical Analysis System (SAS, 2004) versión 9.0. Se llevó a cabo un Análisis de Varianza (ANOVA) y una prueba de medias Tukey. Además, con el uso del programa NTSYSpc versión 2.2 (Numerical Taxonomic Analysis System) (Hampel *et al.*, 2001) se hizo un análisis de componentes principales, mediante el cual se permitió seleccionar las características más discriminantes entre cada grupo.

#### **6.3.2 Caracterización Molecular**

##### ***Material Vegetal***

En la caracterización molecular se emplearon doce accesiones procedentes de cuatro razas de *Arachis*, adicionando el estudio de la raza hirsuta (Cuadro 5).

##### ***Protocolo de Extracción de ADN***

Para la extracción y purificación del ADN se utilizó el protocolo de extracción de Dellaporta *et al.* (1983), combinado con el de Doyle y Doyle (1987) y adaptado con algunas modificaciones en el Laboratorio de Biotecnología de la Universidad Autónoma Chapingo.

La metodología empleada fue la siguiente: Se maceraron 0.3 g de tejido fresco proveniente de hojas jóvenes, con nitrógeno líquido y en mortero con pistilo.

El tejido pulverizado se transfirió a un microtubo Eppendorf de 1.5 mL conteniendo 700  $\mu$ L de amortiguador de extracción CTAB (Tris pH=7.5, 100 mM; EDTA pH =8, 50 mM; NaCl 700 mM, CTAB 1 % (p/v), BME 140 mM y H<sub>2</sub>O) más 0.2 % (v/v) de  $\beta$ - mercaptoetanol previamente colocado a 65 °C, durante 15 minutos.

Se agitó suavemente e incubó por 30 min a 65 °C, se agregó 300  $\mu$ L de acetato de potasio 5 M, agitando por inversión e incubando a 0 °C por 15 min. Se centrifugó 5 min a 12,000 rpm y se transfirió el sobrenadante a otro microtubo. Se agregó 500  $\mu$ L de cloroformo: octanol (24:1), luego se mezcló suavemente por inversión del tubo y centrifugó 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante se transfirió a un tubo Eppendorf que contenía 500  $\mu$ L de isopropanol frío para precipitar el ADN. Se incubó en hielo durante 30 min y enseguida se centrifugó 5 min a 12,000 rpm para rescatar el precipitado. Se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución para dilución. Posteriormente, el ARN se eliminó con 2  $\mu$ L de ARNasa A durante 1 h a 37 °C. El ADN se precipitó adicionando 20  $\mu$ L de acetato de sodio 3M y 200  $\mu$ L de isopropanol frío, mezclar suavemente y dejar incubar 1 h a -20 °C. Posteriormente, se centrifugó 5 min a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante. Luego, el ADN se lavó con 300  $\mu$ L de etanol al 70 % (v/v). Por último, el ADN se resuspendió en 100  $\mu$ L de TE y se guardó a 4 °C.

### ***Concentración y Calidad de ADN***

El ADN obtenido se cuantificó usando un espectrofotómetro JENWAY 6350 UV/vis, calibrado a 260 nM. Con los datos obtenidos se calculó la cantidad de agua que había que agregar para obtener una concentración de 10  $\mu$ g $\cdot\mu$ L<sup>-1</sup>.

La calidad del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0.8 % (p/v). Se colocó una mezcla compuesta de 3 µg de ADN y 1.5 µl de amortiguador de carga (0.1 % (p/v) azul de bromofenol, 0.1 % (p/v) xilen cianol, 30 % (p/v) de Ficoll y 1 % (p/v) de SDS).

El amortiguador de corrida utilizado fue TAE 10 X (40 mM tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub>-EDTA), diluído a una proporción de 0.5 X; la electroforesis se realizó a 80 voltios por un periodo de 2 h; transcurrido este tiempo el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 mg·mL<sup>-1</sup>). Las imágenes se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta KODAK EDAS-290. La calidad del ADN se definió como aceptable, al obtener una banda integra y uniforme por arriba de aproximadamente 12,000 pb, de cada una de las variedades evaluadas (Figura 10). Se utilizó el marcador de peso molecular 1kb ADN ladder plus (GeneRuler).

### ***Cuantificación del ADN***

Se midió la absorbancia de cada muestra con el objetivo de determinar a qué concentración se encontraba su ADN (µg·µL<sup>-1</sup>). Para dicha actividad se usó un espectrofotómetro JENWAY 6350 UV/vis, calibrado a 260 nM y con los datos obtenidos se calculó la cantidad de agua que había que agregar para obtener una concentración de 10 µg·µL<sup>-1</sup>.

### ***Selección de iniciadores***

Se probaron un total de 21 iniciadores RAPD de la series A, B y D de Operon (*Operon Technologies Alameda, CA, USA*), y 25 ISSR de las series P, IAH y

RAH. Después se seleccionaron aquellos que mostraron polimorfismo y patrones de bandas nítidos (Cuadro 12).

### **Condiciones de la PCR**

La amplificación de ADN se realizó mediante la técnica de PCR, con la finalidad de detectar los polimorfismos en las variedades de *Arachis*. Para ello, se utilizó el termociclador Techne TC-512. La mezcla de reacción se realizó en un tubo Eppendorf con un volumen total de 25  $\mu\text{L}$ , y fue igual para el análisis de RAPD y el ISSR, contemplando los siguientes componentes 3.2  $\mu\text{L}$  de agua estéril, 10  $\mu\text{L}$  de dNTPs (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) a 500  $\mu\text{M}$ , 2.5  $\mu\text{L}$  de amortiguador 10 X, 2.0  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM), 3.0  $\mu\text{L}$  de iniciador (10 pM), 0.3  $\mu\text{L}$  de Taq ADN polimerasa ( $5\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) termoestable cuya temperatura óptima es de 72  $^{\circ}\text{C}$ , y 4.0  $\mu\text{L}$  de ADN genómico ( $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) (Cuadro 7).

Cuadro 7. Componentes y volúmenes utilizados en las reacciones de PCR.

<b>Componente</b>	<b>Volumen (<math>\mu\text{L}</math>)</b>
H <sub>2</sub> O bidestilada	3.2
dNTPs (500 $\mu\text{M}$ )	10
Amortiguador (10X)	2.5
$\text{MgCl}_2$ (25 mM)	2.0
Iniciador (10 pM/ $\mu\text{L}$ )	3.0
Enzima Taq ADN Polimerasa ( $5\text{U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ )	0.3
ADN genómico (10 ng/ $\mu\text{L}$ )	4.0
Volumen Total	25.0

Para RAPDs el programa utilizado comprendió: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94  $^{\circ}\text{C}$ ; 38 ciclos (comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión) de 30 seg a 94  $^{\circ}\text{C}$ , 30 seg a 38  $^{\circ}\text{C}$ , y 1 min 30 seg a 72  $^{\circ}\text{C}$ , respectivamente; y al final 1 ciclo de extensión de 3 min

a 72 °C. En cambio, para los ISSR se empleó la programación siguiente: 1 ciclo inicial de desnaturalización de 2 min a 94 °C; 30 ciclos (comprendiendo la desnaturalización, alineamiento y extensión) de 1 min a 94 °C, 1 min a 50 °C, 2 min a 72 °C, respectivamente; y al final 1 ciclo de extensión de 10 min a 72 °C.

### ***Elaboración de Geles***

Una vez completada la reacción, se procedió a realizar la electroforesis de las muestras en geles de agarosa al 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA) durante 1 h a 120 V, en una unidad electroforética horizontal. La cantidad de muestra de reacción que se colocó en el gel fue de 12 µL con una gota de colorante de carga (2 µL). Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg•mL<sup>-1</sup>) y se documentaron bajo luz UV, utilizando un documentador Kodak EDAS 290.

### ***Análisis Estadístico de la Información***

Con el patrón de bandeo obtenido en los geles, se elaboró una Matriz Básica de Datos (MBD), considerando los iniciadores y transformando los datos a binarios, con valores de 0 y 1 para la ausencia y presencia de bandas, respectivamente.

Con la MBD se calculó una matriz de similitud usando el coeficiente de Jaccard y mediante el empleo del software estadístico NTSYS (Numerical Taxonomic Analysis System), Versión 2.2. Con los datos resultantes se hizo un análisis de conglomerados por el método de medias aritméticas (UPGMA, Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average) y los resultados se representaron en un dendrograma que consideró el índice de similitud de Jaccard, además de tomar

cada accesión como una Unidad Taxonómica Operacional (OTU). También se realizó un análisis multivariado representado en gráficas de dos y tres dimensiones. Finalmente, se hicieron remuestreos para la obtención de árboles robustos. Adicionalmente, se realizó un análisis de componentes principales para conocer la contribución de cada iniciador en la determinación de la diversidad genética de las variedades evaluadas.

### **6.3.3 Caracterización Morfológica Vs Molecular**

Los resultados obtenidos de las agrupaciones morfológicas y moleculares fueron comparados mediante correlaciones, obtenidas con la prueba de Mantel, con el programa NTSYS Versión 2.2, confrontando todas las posibles combinaciones entre los dendrogramas: morfológico, RAPD, ISSR y el consenso (RAPD+ISSR).

## 6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.4.1 Caracterización Morfológica

Las accesiones de *Arachis* mostraron variabilidad morfológica desde la forma, color y medidas de la semilla (Figura 7).



Figura 7. Variabilidad de semillas de cacahuete.

En el Cuadro 8 se muestran los valores de las medias, desviación estándar y coeficiente de variación de las características evaluadas, en las cuales se puede observar que los caracteres que presentaron mayor variación fueron: la relación ancho-largo de semilla, el color de hojas y el peso de 100 semillas, con los coeficientes de variación de 70.86 %, 37.03 % y 36.25 %, respectivamente. Por el contrario. Los caracteres con menor variabilidad fueron: color de semilla en luminosidad (10.57 %) y cromaticidad (12.20 %), altura de planta (15.28 %) y área foliar (24.25 %).

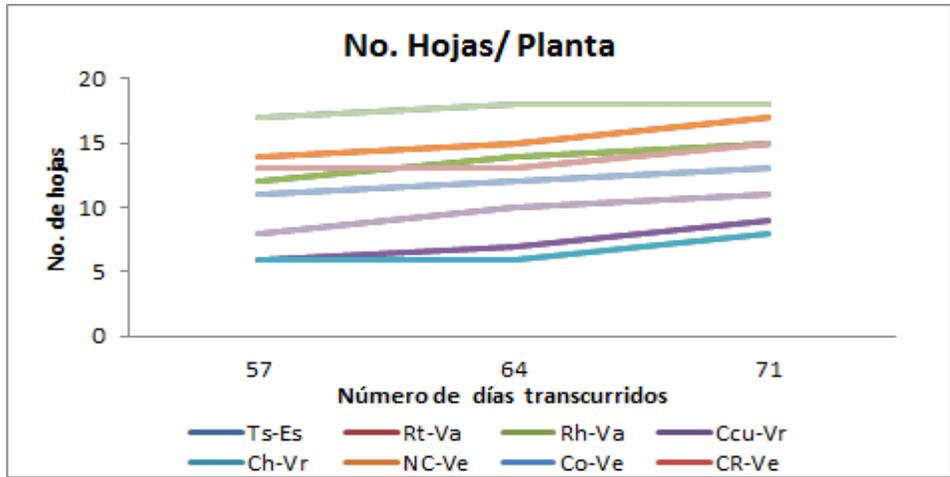
Cuadro 8. Medias y desviaciones estándar de las variables seleccionadas.

Variable	Carácter medido	Media	Desviación estándar	CV (%)
AP	Altura de planta	19.94	3.05	15.28
AF	Área foliar	238.18	57.76	24.25
NH	No. de hojas	13.25	3.65	27.58
CH	Color de las hojas	1.25	0.46	37.03
	Color de semilla:			
CSL	Luminosidad	21.05	2.22	10.57
CSC	Cromaticidad	28.94	3.53	12.20
PCS	Peso de 100 semillas	65.85	23.87	36.25
LS	Largo de semilla	1.93	0.48	25.11
AS	Ancho de semilla	1.48	0.53	36.01
RALS	Rel. ancho / largo de semilla	0.90	0.63	70.86

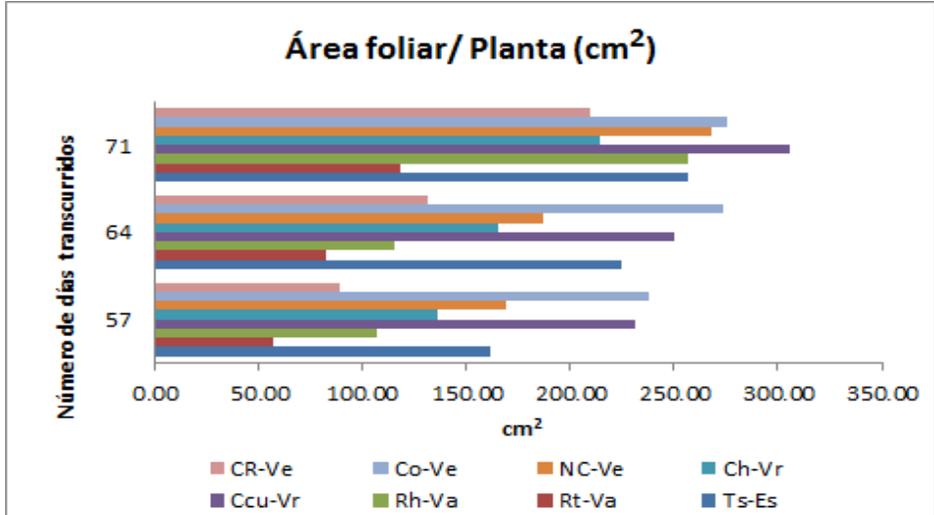
AP= Altura de planta, AF= Área foliar, NH= No. de hojas, CH= Color de las hojas, CSL= Color de semilla Luminosidad, CSC= Color de semilla Cromaticidad, PCS= Peso de 100 semillas, LS= Largo de semilla, AS= Ancho de semilla, RALS= Relación ancho/largo de semilla y CV= Coeficiente de variación.

Con los datos obtenidos y mediante el uso de la prueba de Tukey, realizada en el programa estadístico SAS, fue posible detectar que se presentaron diferencias significativas en todas las variables respuesta evaluadas a excepción del largo de semilla (Anexo 1).

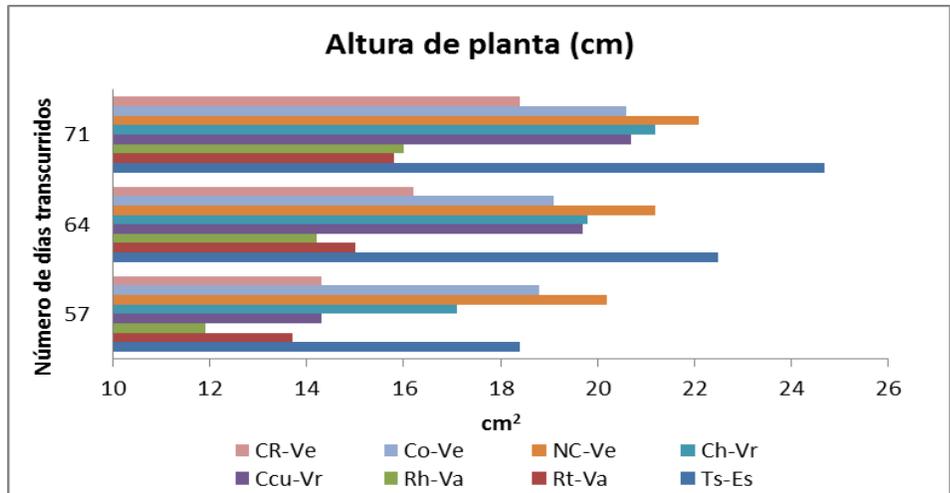
Adicionalmente, la Figura 8 ilustra las tendencias de crecimiento en número de hojas, altura de planta y área foliar, para las 8 variedades evaluadas morfológicamente y considerando tres fechas de toma de datos. Se observó una notable diversidad fenotípica entre las accesiones estudiadas.



**A**



**B**



**C**

Figura 8. Gráficas de crecimiento por planta de A) No. de Hojas, B) Área foliar y C) Altura.

La matriz de correlación entre las variables analizadas se muestra en el Cuadro 9, donde se indica que existe una correlación alta y positiva entre las variables: ancho de semilla (AS) y relación ancho- largo de semilla (RALS) con un valor de 0.98; entre número de hojas (NH) y altura de planta (AP) con una correlación de 0.76; peso de 100 semillas (PCS) y número de hojas (NH)(0.70) y número de hojas (NH) con área foliar (AF)(0.67).

Estos resultados pueden ser un indicativo de que existe información redundante entre las variables y por lo tanto, con solo considerar algunas de ellas se puede tener representatividad de todas, dando explicación a la caracterización morfológica, resultado del aporte de todas las variables.

Cuadro 9. Matriz de correlación de las variables morfológicas.

Var	AP	AF	NH	CH	CSL	CSC	PCS	LS	AS	RALS
AP	1.00									
AF	0.54	1.00								
NH	<b>0.76</b>	<b>0.67</b>	1.00							
CH	-0.20	-0.48	-0.21	1.00						
CSL	-0.14	<b>-0.71</b>	-0.36	0.26	1.00					
CSC	-0.06	-0.31	0.16	0.25	0.56	1.00				
PCS	0.44	0.57	<b>0.70</b>	-0.20	<b>-0.79</b>	-0.26	1.00			
LS	0.01	-0.13	-0.24	-0.48	0.06	-0.03	0.04	1.00		
AS	0.41	0.51	0.64	0.32	-0.41	-0.10	0.42	<b>-0.84</b>	1.00	
RALS	0.28	0.38	0.52	0.38	-0.29	-0.02	0.26	<b>-0.93</b>	<b>0.98</b>	1.00

Var= Variable, AP= Altura de planta, AF= Área foliar, NH= No. de hojas, CH= Color de las hojas, CSL= Color de semilla Luminosidad, CSC= Color de semilla Cromaticidad, PCS= Peso de 100 semillas, LS= Largo de semilla, AS= Ancho de semilla, RALS= Relación ancho/ largo de semilla.

Por otro lado, las correlaciones negativas más altas fueron: relación ancho-largo de semilla (RALS) y largo de semilla (LS) (-0.93); ancho de semilla (AS) y largo de semilla (LS) (-0.84); peso de 100 semillas (PCS) y luminosidad de color de

semilla (CSL) (-0.79) y finalmente luminosidad (CSL) con área foliar (AF), con un coeficiente de correlación de -0.71. Dichos valores son un indicador de que al incrementarse el valor de una variable el de su contraparte se ve disminuído. En el resto de las variables se encontró baja correlación entre las mismas.

Una vez obtenidas las correlaciones de las variables cuantificadas se realizó un análisis de agrupamiento o cluster para determinar relaciones entre las variedades. En el dendrograma morfológico obtenido (Figura 9) se observa la formación de cinco grupos de accesiones basados en una línea de corte localizada a una altura de 1.16.

El grupo I se formó con la variedad Tersal, raza Español relacionada más directamente con la accesión Criollo de Cuauchichinola, raza Virginia rastrero, lo que no es muy consistente, ya que se espera que las variedades de una misma raza se agrupen juntas.

El grupo II agrupó a dos individuos de la raza Virginia erecto (NC17-UACH y criollo de Ocozocutzutla).

El grupo III quedó representado por la variedad Rojo de Tlaltenango, raza Valencia; mientras que el grupo IV integra a una accesión de la raza Valencia (Rojo de Huazulco) y una de la Virginia erecto (CROC 10).

Finalmente, el grupo V relacionado directamente al IV lo integra la variedad Criollo de Huitzucó.

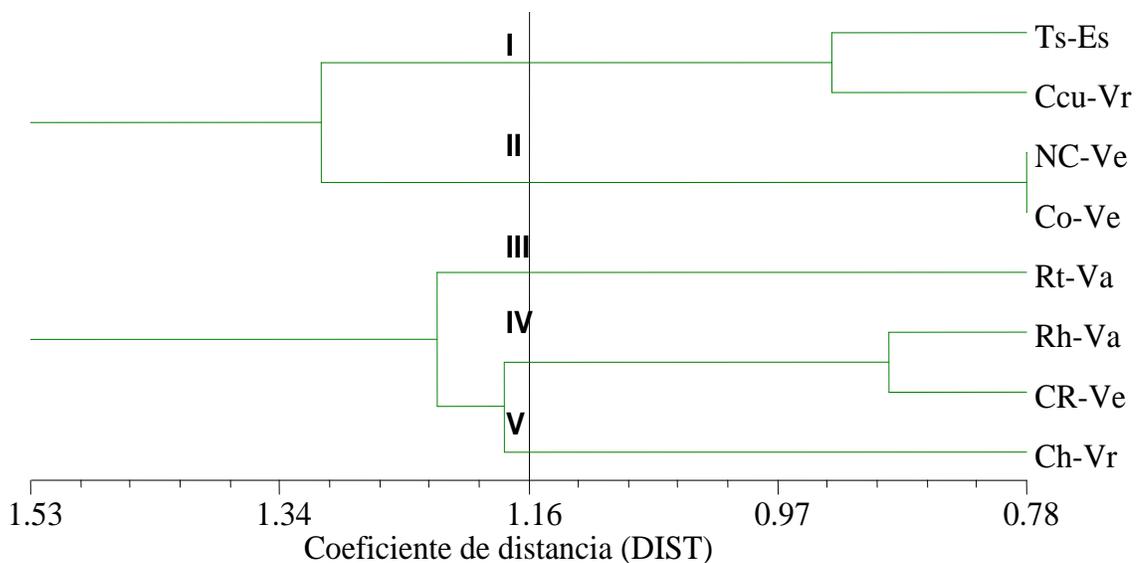


Figura 9. Dendrograma morfológico remuestreado.

Por otro lado, en el Cuadro 10 se muestra la contribución de diez componentes (CP) para explicar la variabilidad detectada en las variedades evaluadas. Los cuatro primeros componentes explican 91.56 % de la variabilidad morfológica de los materiales de cacahuate. Obsérvese que después del componente cuatro la aportación del resto de los componentes es muy poca y el 100 % del porcentaje acumulado se alcanza con el componente siete.

Cuadro 10. Componentes, eigenvalores y porcentajes individuales y acumulados del análisis de componentes principales.

Componente	Eigenvalor	Porcentaje (%)	
		Individual	Acumulado
1	4.38	43.83	43.83
2	2.63	26.31	70.14
3	1.43	14.28	84.42
4	0.71	7.14	91.56
5	0.58	5.75	97.31
6	0.22	2.23	99.54
7	0.05	0.46	100.00
8	0.00	0.00	100.00
9	0.00	0.00	100.00
10	0.00	0.00	100.00

También, en el Cuadro 11 se muestran las variables morfológicas que más contribuyen a cada componente principal (CP). Para el CP1 la variable que más aporta fue el ancho de semilla, para el CP2 el largo de semilla, para el CP3 la cromaticidad del color de la semilla y para el CP4 la luminosidad del color de la semilla y el área foliar.

Cuadro 11. Contribución de las variables en los componentes principales 1, 2, 3 y 4.

Variable	Componente Principal (CP)			
	1	2	3	4
AP	0.62	0.22	0.54	0.18
AF	0.80	0.41	-0.01	<b>0.25</b>
NH	0.83	0.11	0.51	-0.08
CH	-0.08	<b>-0.81</b>	<b>-0.11</b>	-0.41
CSL	<b>-0.68</b>	-0.42	0.50	<b>0.25</b>
CSC	-0.24	-0.39	<b>0.74</b>	-0.25
PCS	0.73	0.41	-0.02	<b>-0.52</b>
LS	-0.51	<b>0.79</b>	0.20	-0.20
AS	<b>0.87</b>	-0.48	-0.07	0.04
RALS	0.77	-0.62	-0.09	0.10

AP= Altura de planta, AF= Área foliar, NH= No. de hojas, CH= Color de las hojas, CSL= Color de semilla Luminosidad, CSC= Color de semilla Cromaticidad, PCS= Peso de 100 semillas, LS= Largo de semilla, AS= Ancho de semilla, RALS= Relación ancho/largo de semilla.

Con base en los resultados obtenidos, se infiere que existe un alto nivel de diversidad morfológica entre las variedades de *A. hypogaea* L. evaluadas en este estudio, lo que coincide con los niveles de diversidad genética detectados por otros investigadores (Tombs, 1963, citado por Jayashree *et al.*, 2005).

#### 6.4.2 Caracterización Molecular

En la caracterización molecular y el análisis de diversidad genética intrapoblacional, primero fue necesario realizar una prueba de calidad de ADN, seleccionando al azar algunas variedades (cada una producto de la mezcla de ADN de 5 individuos), la cual indicó que el protocolo utilizado para la extracción de ADN de individuos en las diferentes poblaciones evaluadas fue aceptable, ya que durante la electroforesis en gel de agarosa se observó la presencia de una banda bien definida y de alto peso molecular para la mayoría de las accesiones (Figura 10).

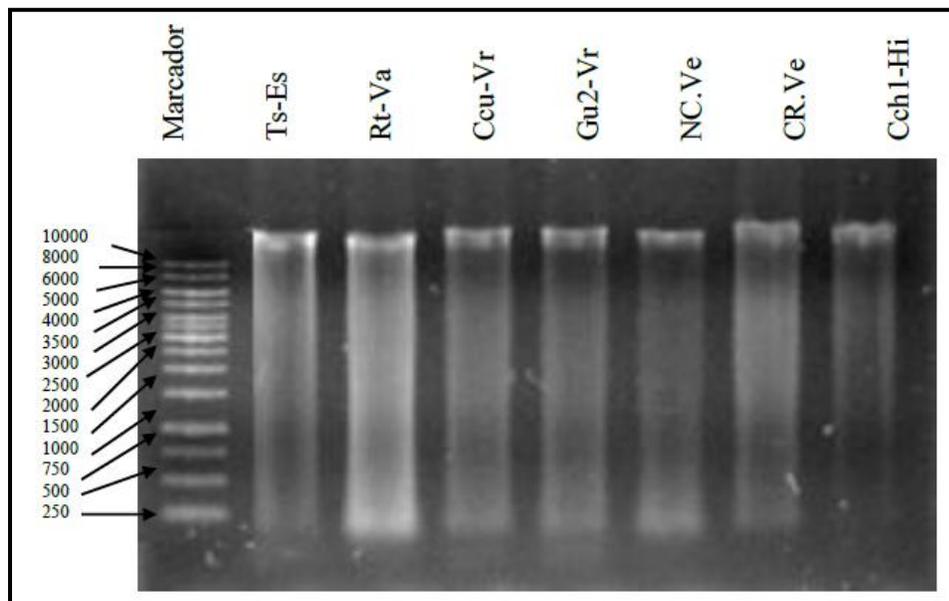


Figura 10. Electroforesis de gel de calidad de ADN.

En seguida y una vez cuantificado el ADN se realizaron pruebas de la selección de los iniciadores RAPDs e ISSR, esta elección de los mejores se determinó en función al patrón de bandeo obtenido, en el que se buscó nitidez de bandas y diferencias polimórficas notables (Figura 11).

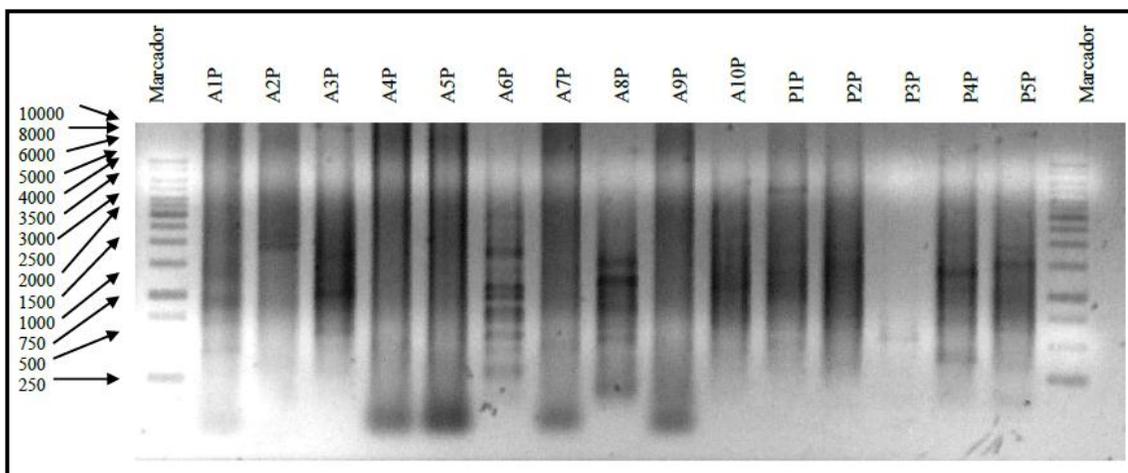


Figura 11. Ejemplo de prueba de iniciadores tipo ISSR.

Para la detección de polimorfismos interpoblacionales se utilizaron 13 iniciadores RAPD y 17 ISSR (Cuadro 12). En el caso de RAPD's se encontraron iniciadores que detectaron desde 3 (OPA12 y OPB09) hasta 18 productos amplificados (OPD08) y con valores de polimorfismo desde 9.1 % hasta 66.7 %, con un promedio de 34.28 %.

Los iniciadores ISSR detectaron desde 2 bandas (A6 y RAH05) hasta 16 (IAH04), con una variación en el porcentaje polimórfico superior a los RAPD's de 20 % al 100 %, con un promedio de 56.12 % (Cuadro 12).

Adicionalmente, el análisis de componentes principales (CP) para los iniciadores utilizados indicó que la contribución de los primeros tres componentes explica el 100 % de la variabilidad genética de las variedades evaluadas, siendo los iniciadores OPD15, OPD18 y OPD08 los que más contribuyeron a los componentes CP1, CP2 y CP3, respectivamente. Mientras que para el CP1 el que menos contribuyó fue OPD18, en el CP2 el IAH03 y en el CP3 el A6 (Anexos de 2- 5).

Cuadro 12. Iniciadores seleccionados para la caracterización de variedades.

Iniciador	Secuencia	PA	No. BM	No. BP	Polimorfismo (%)
<b>RAPD</b>					
OPA09	5'-GGGTAACGCC-3'	16	10	6	37.5
OPA11	5'-CAATCGCCGT-3'	15	10	5	33.3
OPA12	5'-TCGGCGATAG-3'	3	1	2	66.7
OPA17	5'-GACCGCTTGT-3'	10	6	4	40.0
OPA19	5'-CAAACGTCGG-3'	11	8	3	27.3
OPA20	5'-GTTGCGATCC-3'	12	7	5	41.7
OPB09	5'-TGGGGGACTC-3'	3	1	2	66.7
OPB10	5'-CTGCTGGGAC-3'	10	7	3	30.0
OPD05	5'-TGAGCGGACA-3'	14	12	2	14.3
OPD08	5'-GTGTGCCCCA-3'	18	12	6	33.3
OPD15	5'-CATCCGTGCT-3'	9	6	3	33.3
OPD18	5'-GAGAGCCAAC-3'	11	10	1	9.1
OPD20	5'-ACCCGGTCAC-3'	8	7	1	12.5
	<b>Promedio</b>	<b>10.77</b>	<b>7.46</b>	<b>3.31</b>	<b>34.28</b>
<b>ISSR</b>					
A1	5'-ACACACACACACACT-3'	13	4	9	69.23
A2	5'-CCGCCCGCCGCCGCCG-3'	12	8	4	33.33
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTC-3'	6	4	2	33.33
A4	5'-CACACACACACACAAG-3'	5	2	3	60.00
A6	5'-CTCTCTCTCTCTTG-3'	2	0	2	100.00
A7	5'-CACACACACACACAAC-3'	6	2	4	66.67
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGT-3'	6	4	2	33.33
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA-3'	5	3	2	40.00
IAH03	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	11	2	9	81.82
IAH04	5'-CACCACCACGC-3'	16	7	9	56.25
RAH01	5'-ACGGATCCTG-3'	10	8	2	20.00
RAH02	5'-CCGAATTCCC-3'	4	1	3	75.00
RAH04	5'-AAAGCTGCGG-3'	10	5	5	50.00
RAH05	5'-TCTGTGCCAC-3'	2	0	2	100.00
P1	5'-GAGCAACAACAACA-3'	13	7	6	46.15
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAG-3'	9	7	2	22.22
P4	5'-ATGATGATGATG-3'	3	1	2	66.67
	<b>Promedio</b>	<b>7.82</b>	<b>3.82</b>	<b>4</b>	<b>56.12</b>

PA= Productos amplificados, No. BM= Número de bandas monomórficas, No. BP= Número de bandas polimórficas.

Los iniciadores seleccionados mostraron un patrón de bandeo nítido y polimórfico para RAPD y para ISSR (Figura 12 y 13, respectivamente), a partir de los cuales se obtuvo la Matriz Básica de Datos (MBD).

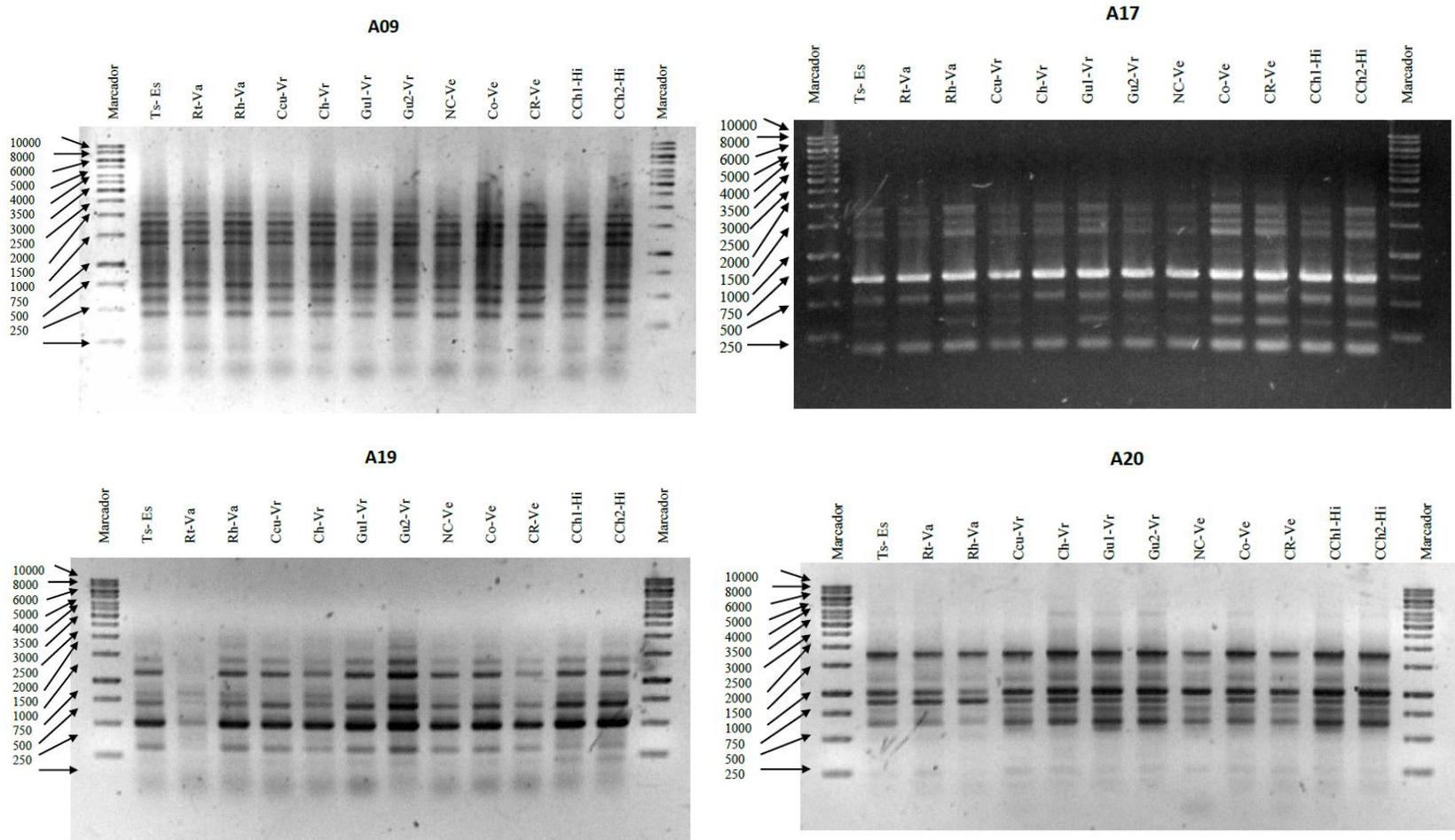


Figura 12. Patrones de bandeos RAPDs de los genotipos de *Arachis* evaluados con los iniciadores A09, A17, A19 y A20, utilizados en el análisis de variedades.

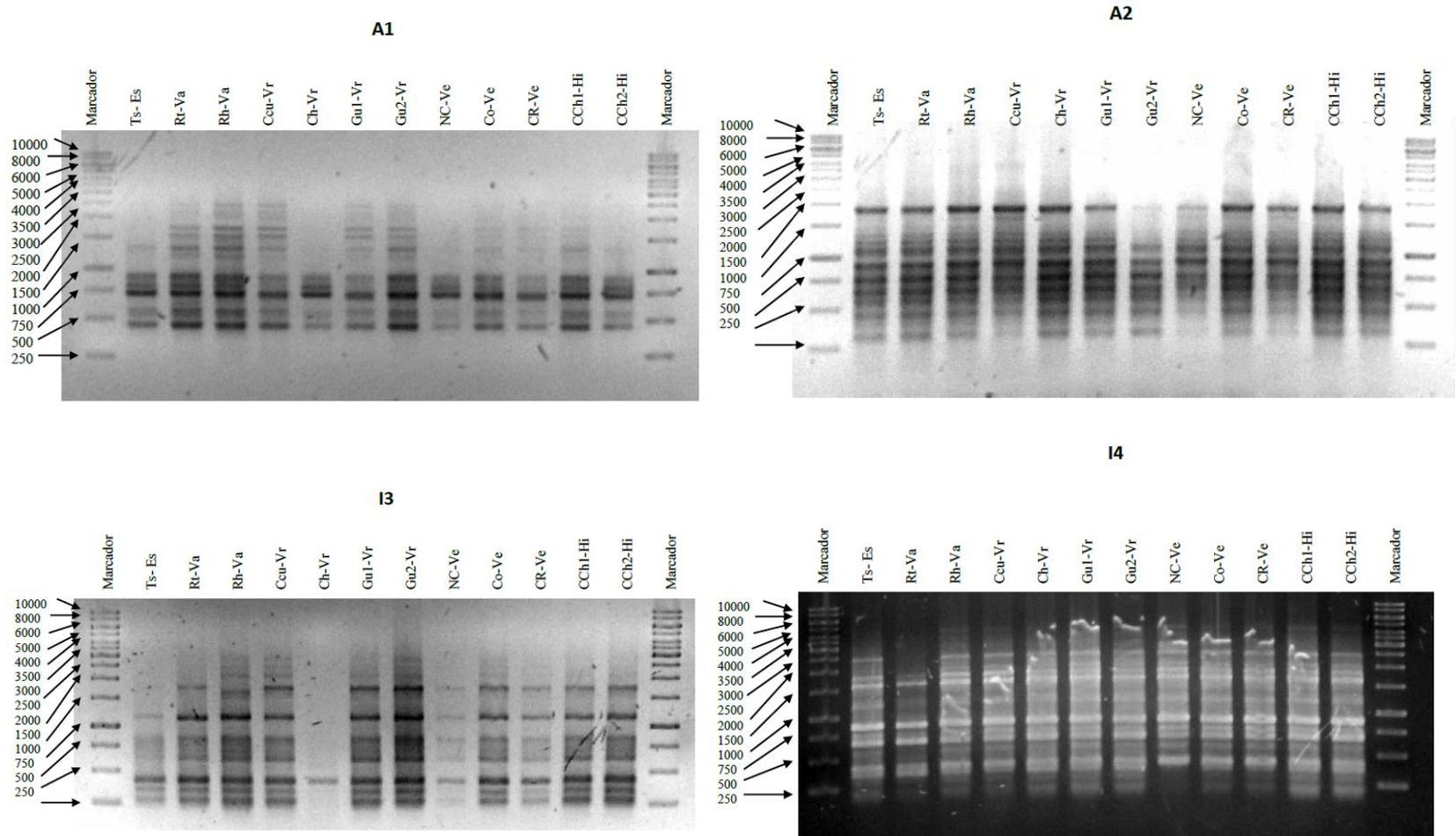


Figura 13. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de *Arachis* evaluados con los iniciadores A1, A2, I3 e I4, utilizados en el análisis de variedades.

### ***Analisis de escalado multidimensional***

Se realizó el análisis de escalado multidimensional de los datos obtenidos tanto de la matriz RAPD, ISSR y consenso (RAPD+ISSR), obteniendo resultados en dos (Figura 14) y tres (Figura 15) dimensiones.

En los gráficos de 2D y 3D provenientes de RAPD (Figura 14A y 15A) se observó la formación de cuatro grupos, donde el grupo I se conformó de variedades de la raza Virginia (erectas y rastreras), el grupo II de accesiones de la raza Valencia, el III de las dos variedades de Hirsuta y una de Virginia rastrero y el IV de la variedad tipo Español.

En cambio, los ISSR generaron gráficos en 2D y 3D (Figura 14B y 15B) con la formación de 5 grupos, el I con variedades Virginia (erectas y rastreras), el II con accesiones Virginia rastreras, el III con los dos materiales de Hirsuta, el IV con un material de Valencia y el V con la variedad de la raza Español.

Por su parte, las representaciones 2D y 3D (Figura 14C y 15C) de la matriz consenso (RAPD +ISSR) mostraron la formación de 5 grupos, el I con variedades Virginia (erectas y rastreras), el II con accesiones Virginia rastreras, el III con los dos materiales de Hirsuta, el IV con un material de Valencia y el V con la variedad de la raza Español. Este agrupamiento es más semejante a utilizar ISSR por separado que a emplear solo marcadores RAPD.

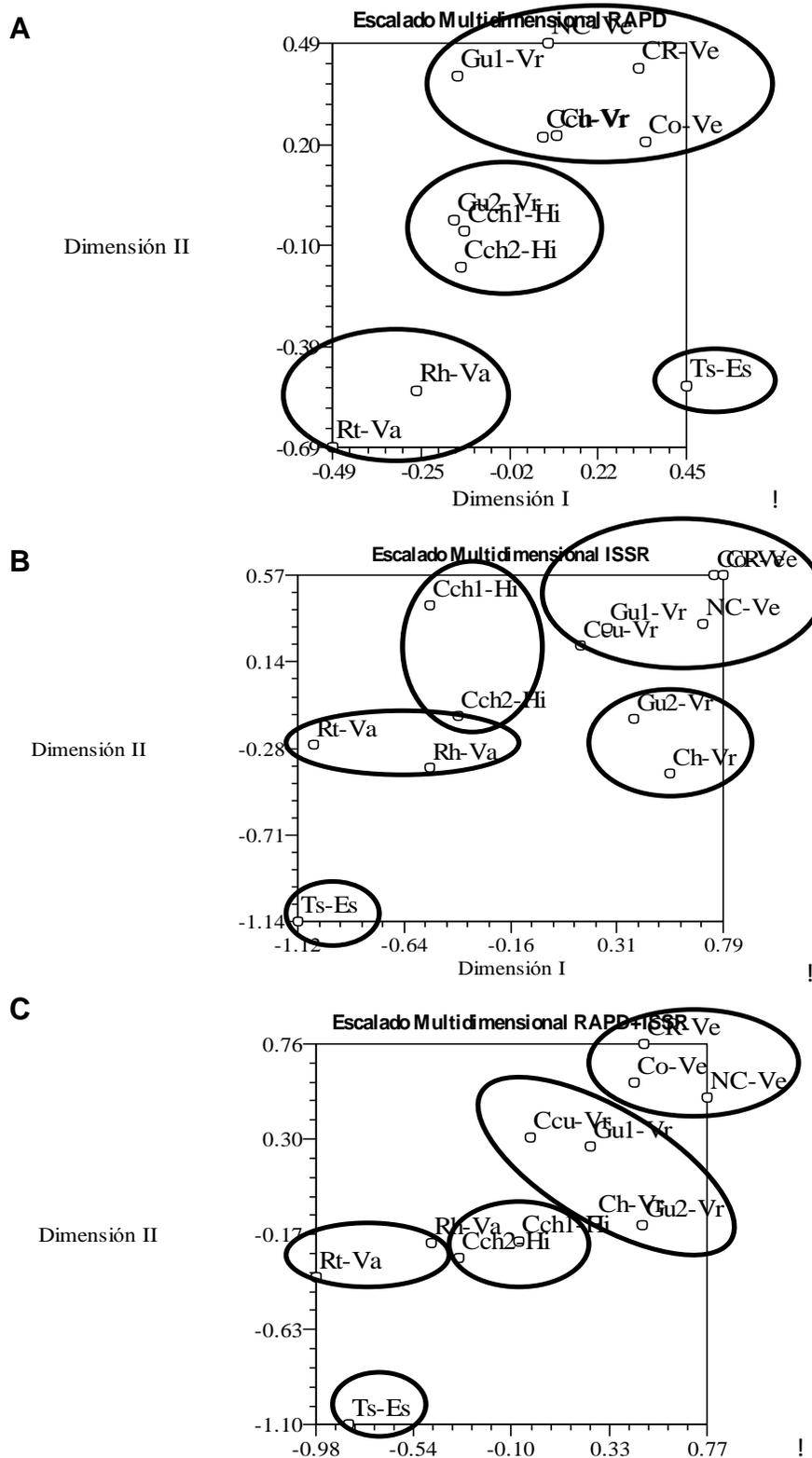


Figura 14. Formación de grupos de genotipos de *Arachis hypogaea* L. usando marcadores: A) RAPDs, B) ISSR y C) Consenso (RAPD+ISSR).

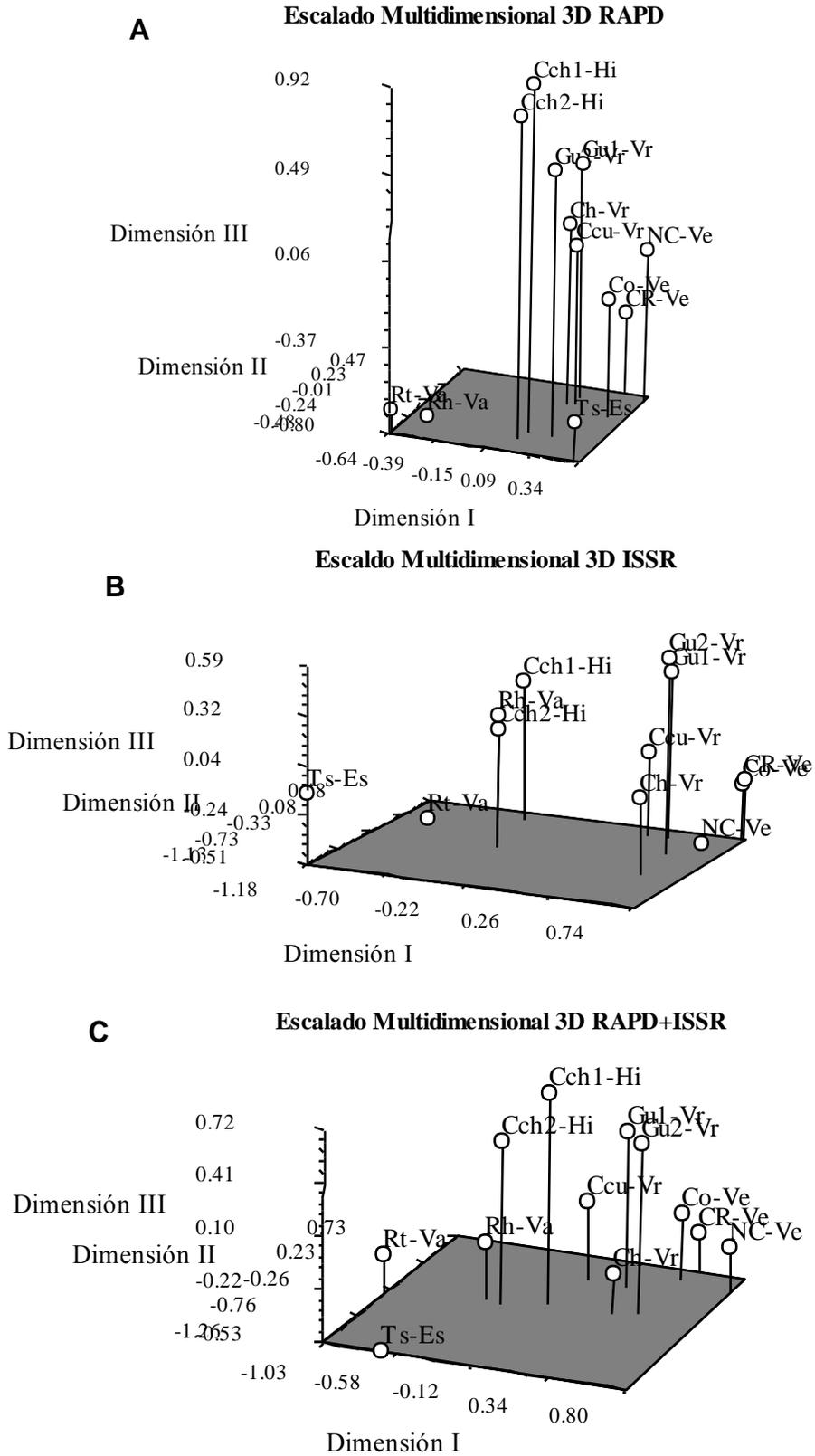


Figura 15. Gráfica en 3D mostrando la distribución de grupos de los genotipos de *Arachis* utilizando datos de: A) RAPD, B) ISSR y C) RAPD+ISSR.

Del análisis de la información generada se concluye que se forman cuatro grupos principales: el I conformado por los materiales de la raza Virginia (erectos y rastreros), el II por los Valencia, el III por los Hirsuta y el IV por el tipo Español. Además, se observa que los marcadores ISSR permitieron discriminar mejor las razas de cacahuate, al diferenciar claramente los grupos formados.

### ***Agrupamiento en dendrogramas***

Mediante un análisis de conglomerados de los marcadores tipo RAPD se obtuvo un dendrograma remuestreado (1000 remuestreos), que generó tres grupos a un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.90 (Figura 16A), quedando integrados de la manera siguiente:

Grupo I) *Arachis hypogaea*, raza Español (Tersal)

Grupo II) *Arachis hypogaea*, raza Valencia (Rojo de Tlaltenango y Rojo de Huazulco)

Grupo III) *Arachis hypogaea*, raza Virginia (Criollo de Cuauchichinola, Criollo de Huitzucó, De Guía 1, NC17-UACH, Criollo de Ocozocuautila, CROC-10 y De Guía 2).

Grupo IV) *Arachis hypogaea*, raza Hirsuta (Criollo chino1 y Criollo chino 2).

Por otra parte, el análisis de conglomerados de datos derivados de ISSR mostró la formación de cinco grupos a un coeficiente de similitud de 0.83 (Figura 16B).

Los grupos se conformaron de la manera siguiente:

Grupo I) *Arachis hypogaea*, raza Español (Tersal)

Grupo II) *Arachis hypogaea*, raza Valencia (Rojo de Tlaltenango y Rojo de Huazulco)

Grupo III) *Arachis hypogaea*, raza Virginia rastrero (Criollo de Cuauchichinola, De Guía 1, De Guía 2 y Criollo de Huitzuco).

Grupo IV) *Arachis hypogaea*, raza Hirsuta (Criollo chino 1 y Criollo chino 2).

Grupo V) *Arachis hypogaea*, raza Virginia erecto (NC17-UACH, Criollo de Ocozocuautila, CROC-10).

Al realizar un dendrograma con los datos de consenso "RAPD + ISSR" a fin de determinar si se lograba un agrupamiento más adecuado de las especies y razas estudiadas (Figura 16C) se obtuvo la formación de cinco grupos a un coeficiente de similitud de 0.87. Los grupos se distinguieron como sigue:

Grupo I) *Arachis hypogaea*, raza Español (Tersal)

Grupo II) *Arachis hypogaea*, raza Valencia (Rojo de Tlaltenango y Rojo de Huazulco)

Grupo III) *Arachis hypogaea*, raza Virginia rastrero (Criollo de Cuauchichinola, De Guía 1, De Guía 2 y Criollo de Huitzuco).

Grupo IV) *Arachis hypogaea*, raza Hirsuta (Criollo chino 1 y Criollo chino 2).

Grupo V) *Arachis hypogaea*, raza Virginia erecto (NC17-UACH, Criollo de Ocozocuautila, CROC-10).

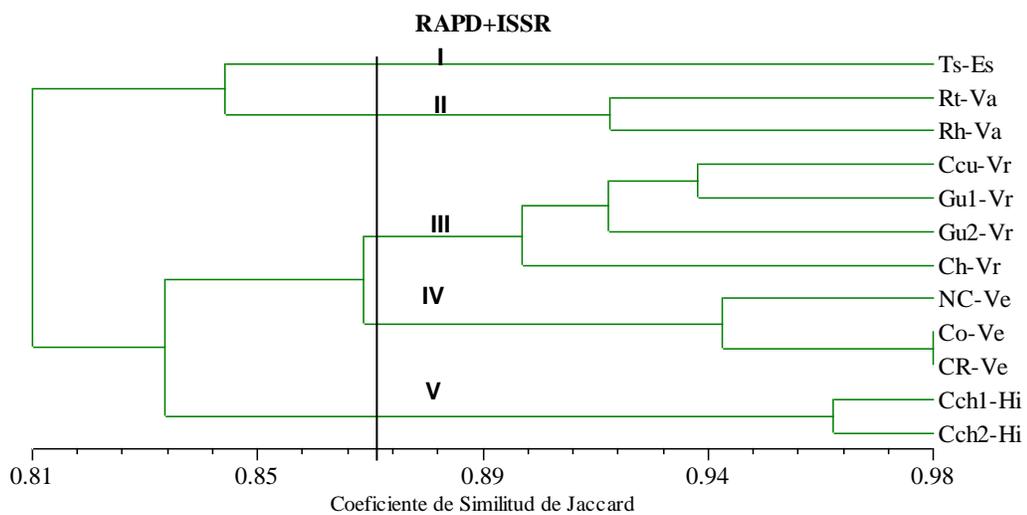
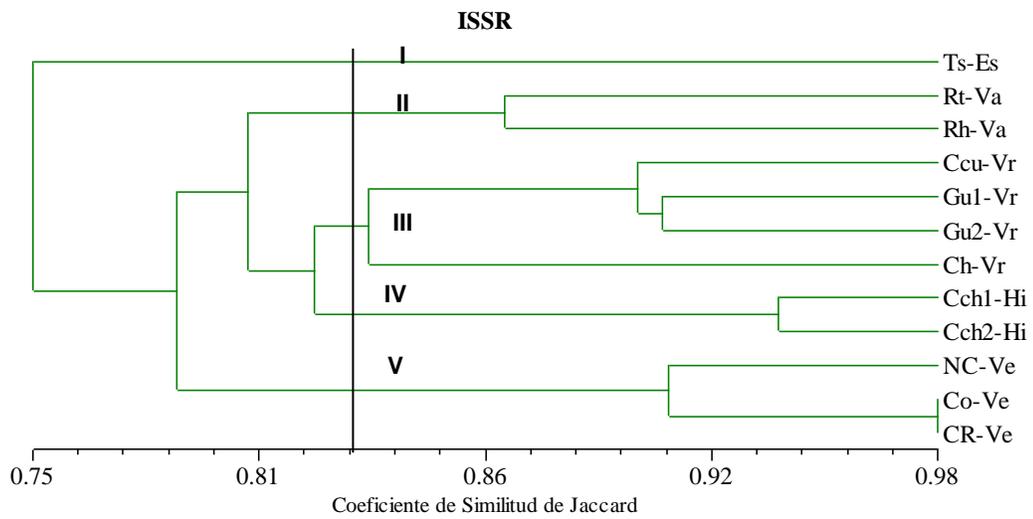
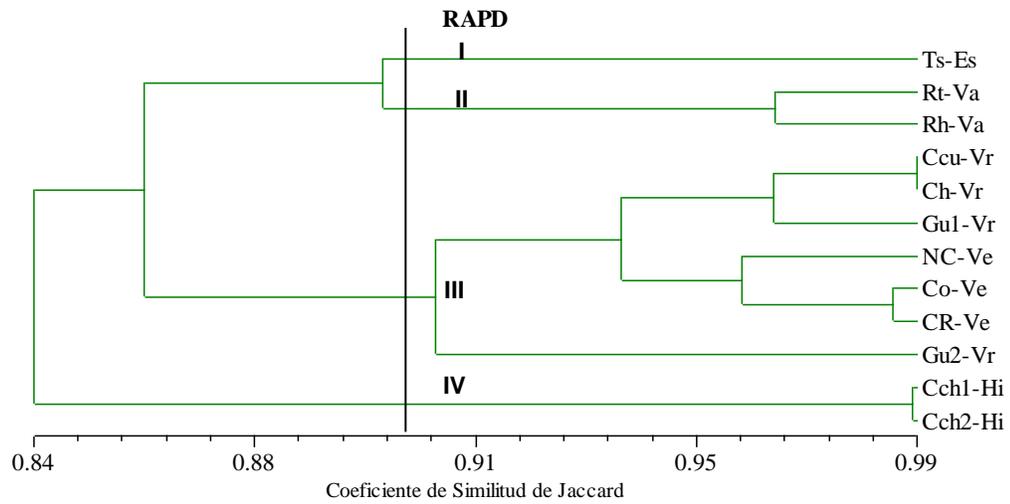


Figura 16. Dendrogramas remuestreados generados a partir de datos de marcadores moleculares: A) RAPDs, B) ISSR y C) Consenso (RAPD+ISSR).

Según la línea de corte de los tres dendrogramas se observa que *A. hypogaea* raza Español se encuentra más relacionada con *A. hypogaea* Valencia, y estas a su vez con *A. hypogaea* Virginia, siendo las menos relacionada la *A. hypogaea* Hirsuta. Estos resultados están de acuerdo con las relaciones filogenéticas previamente establecidas (Krapovickas y Gregory, 1994).

#### **6.4.3 Caracterización Morfológica Vs Molecular**

Se llevó a cabo una prueba de Mantel para determinar el valor de correlación existente entre las matrices obtenidas para los diferentes marcadores evaluados en este trabajo (marcadores morfológicos, marcadores moleculares incluyendo RAPD, ISSR y RAPD+ISSR, mas todas sus posibles combinaciones (Cuadro 13 y Figuras 17 y 18).

Los valores de correlación entre matrices generadas con datos de marcadores Morfológicos vs RAPD, ISSR, RAPD+ISSR y RAPD+ISSR+ Morfológico, fueron negativos en todos los casos, lo que indica que la información da origen a árboles muy diferentes.

La prueba de Mantel entre matrices obtenidas con marcadores RAPD vs ISSR mostró un valor de  $r=0.81$ , lo que indica que los datos de los dos marcadores dan origen a árboles muy parecidos (Figura 17 A).

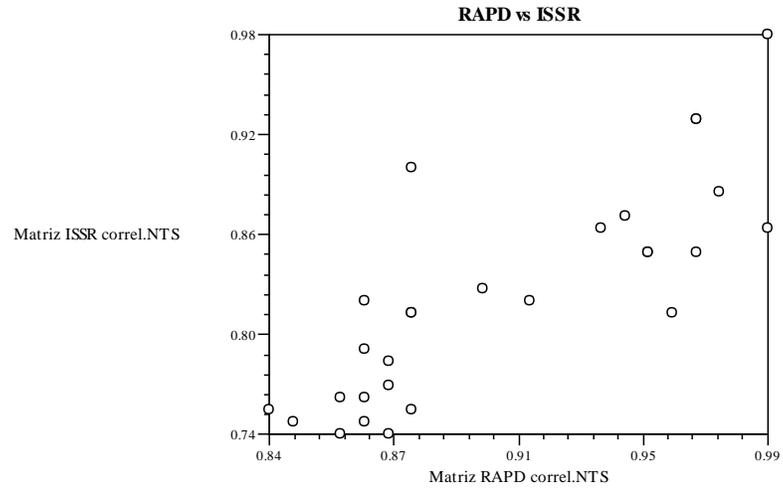
Adicionalmente, se calculó la correlación entre las matrices de marcadores RAPD vs RAPD+ISSR y RAPD vs RAPD+ISSR+Morfológico, presentando valores de  $r=0.94$  en ambos casos, lo que indica que los datos de los dos marcadores también dan origen a árboles muy similares. En la Figura 17 B y C se muestra esta correlación.

Para el caso de los ISSR vs RAPD+ISSR e ISSR vs RAPD+ISSR+Morfológico, resultaron valores de  $r= 0.96$ , siendo también muy parecidos (Figura 18 A y B). La prueba de Mantel para identificar la correlación que hay entre los resultados de consenso (RAPD + ISSR) vs RAPD+ISSR+Morfológico generó un valor de  $r=0.99$ , lo que representa una similitud muy alta. La Figura 18 C muestra el grado de correlación existente entre los datos generados con ambos marcadores.

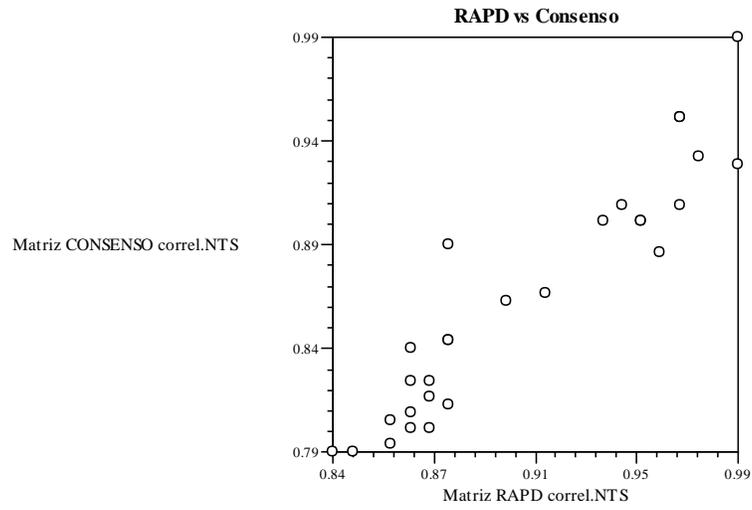
Cuadro 13. Valores de correlación obtenidos con la prueba de Mantel.

<b>Marcador</b>	<b>Correlación de Mantel</b>
Morfológico Vs RAPD	-0.11861
Morfológico Vs ISSR	-0.15526
Morfológico Vs RAPD + ISSR	-0.14625
Morfológico Vs RAPD + ISSR + Morfológico	-0.11004
RAPD vs ISSR	0.81353**
RAPD vs RAPD + ISSR	0.93824**
RAPD Vs RAPD + ISSR + Morfológico	0.93830**
ISSR Vs RAPD + ISSR	0.96449**
ISSR Vs RAPD + ISSR + Morfológico	0.96332**
RAPD + ISSR Vs RAPD + ISSR + Morfológico	0.99933**

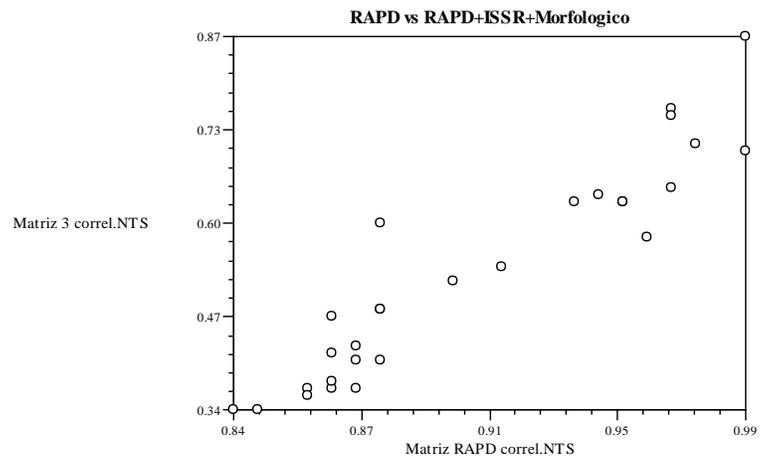
\*\*= Altamente significativa



**A**

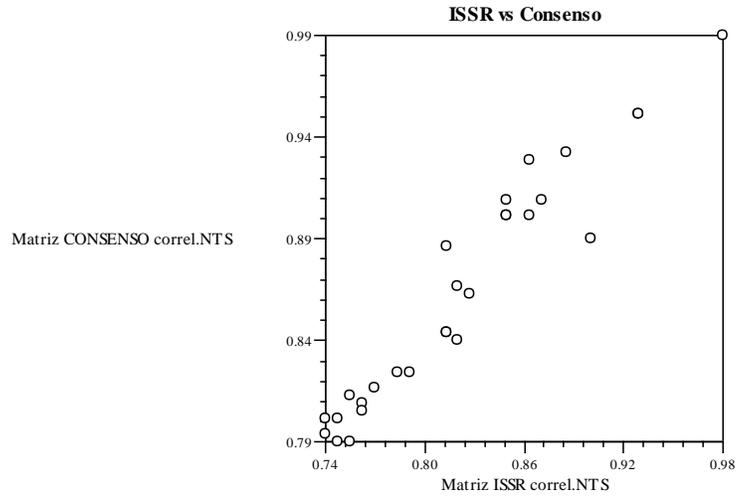


**B**

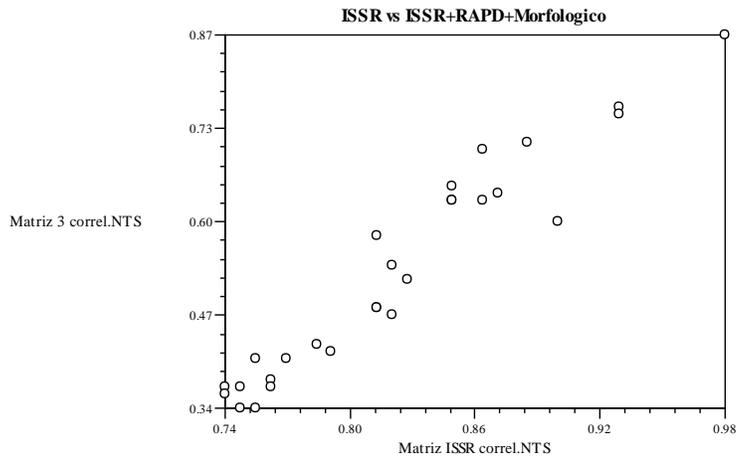


**C**

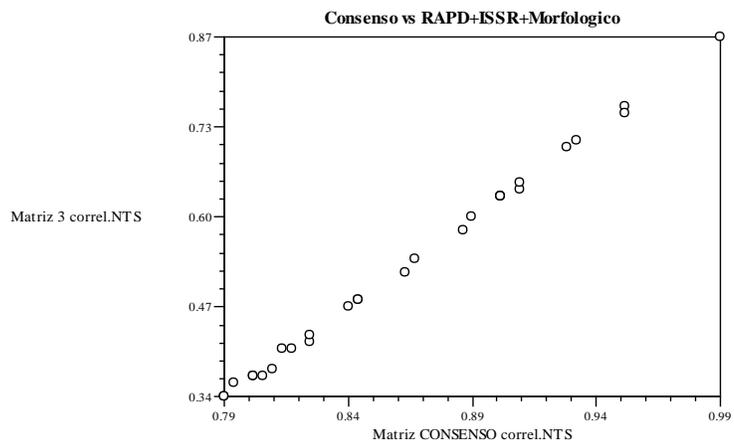
Figura 17. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: RAPD, ISSR, Consenso y Morfológico+RAPD+ISSR.



**A**



**B**



**C**

Figura 18. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: RAPD, ISSR, Consenso y Morfológico+RAPD+ISSR.

## 6.5 CONCLUSIONES PARTICULARES

1. La caracterización molecular fue superior a la caracterización morfológica para el agrupamiento de razas de cacahuate (*A. hypogaea* L.) y más acorde a la filogenia de la especie.
2. El primer componente principal aportó el 43.83 % de la variabilidad de las accesiones analizadas.
3. Las variables que más contribuyeron a los componentes principales fueron los caracteres de semilla: ancho, largo, cromaticidad y luminosidad de tegumento.
4. Los análisis de RAPD e ISSR revelaron que las razas más cercanamente relacionadas son *A. hypogaea* Español y *A. hypogaea* Valencia, ya que ambas pertenecen a la subespecie *fastigiata*, mientras que la más alejada es la tipo *A. hypogaea* *Hirsuta*.
5. Los marcadores ISSR fueron superiores a los marcadores RAPD en el proceso de agrupamiento y discriminación de razas y variedades de *Arachis*.
6. Los iniciadores más discriminantes en el agrupamiento de variedades fueron OPD08, OPD15 y OPD18.

## VII. ETAPA 2: DIVERSIDAD GENÉTICA DE POBLACIONES

### 7.1 INTRODUCCIÓN

El género *Arachis* es nativo de la región que incluye Brasil Central y países vecinos, como Bolivia, Argentina, Perú y Ecuador. El conocimiento de la diversidad genética de especies de cacahuate (*Arachis* spp.) silvestres y cultivadas es esencial para el diseño de estrategias de colecta, conservación y uso de germoplasma en el desarrollo de variedades. El cacahuate cultivado presenta un porcentaje de variabilidad considerable en varios niveles morfológico, fisiológico y agronómico. Sin embargo, poca variación ha sido detectada a nivel de ADN usando técnicas como RAPDs, AFLPs y RFLPs. Los microsatélites o SSR (Secuencias Simples Repetidas) son marcadores genéticos codominantes, multialélicos y altamente polimórficos, apropiados para estudios de diversidad genética. Los microsatelites pueden también, ser usados para dar soporte a inferencias filogenéticas y análisis de variabilidad en accesiones. El bajo nivel de variabilidad en cacahuate cultivado se ha atribuido a tres causas: (1) barreras al flujo genético de especies diploides relacionadas con el cacahuate domesticado, como una consecuencia del evento de poliploidización; (2) poliploidización reciente de uno o pocos individuos de cada especie parental diploide o (3) el uso de pocas líneas élite mejoradas y poco germoplasma exótico en programas de mejoramiento, resultando en una base genética reducida (De Carvalho *et al.*, 2004).

El análisis de marcadores moleculares, usado para variaciones fenotípicas es una poderosa herramienta para el agrupamiento de genotipos basados en datos

de distancias genéticas y para la selección de los progenitores que pueden constituir nuevas poblaciones mejoradas. En el contexto de la conservación *ex situ*, se ha demostrado que los marcadores moleculares son muy utilizados para la conservación de colectas de germoplasma (Westman, 1997).

## 7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- 🌱 Calcular la diversidad genética presente en 12 poblaciones de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), utilizando marcadores tipo RAPD e ISSR.
- 🌱 Comparar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones para definir a cual de ellas se atribuye mayor diversidad de la especie.

## 7.3 MATERIALES Y MÉTODOS

### ***Selección de Iniciadores***

De los iniciadores probados se seleccionaron 6 RAPD y 6 ISSR para realizar el análisis de poblaciones, considerando 5 individuos por accesión (Cuadro 14).

### ***Análisis Estadístico de la Información***

Se utilizó el programa Popgen Versión 32 para realizar el análisis de poblaciones, considerando como muestra a cinco individuos de cada población. En el análisis se estimaron parámetros como: *loci* polimórficos (LP), porcentaje de *loci* polimórficos (LP (%)), número de alelos observados por locus (Na), desviaciones estándar (DE), número efectivo de alelos por locus (Ne), índice de diversidad genética de Nei (h), índice de diversidad genética de Shannon (I),

coeficiente de diferenciación genética entre poblaciones ( $G_{ST}$ ) y número de individuos migrantes ( $N_m$ ).

#### 7.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los iniciadores utilizados (Cuadro 14) permitieron detectar la presencia de polimorfismo en los individuos dentro de las poblaciones evaluadas, obteniendo patrones de bandeo a partir de los que se construyó la Matriz Básica de Datos (MBD) (Figuras 19 y 20).

Los iniciadores que generaron mayor número de bandas fueron los ISSR presentándose un total de 77 bandas, en cambio con los RAPD's sólo se obtuvo un total de 52. Los iniciadores RAPD detectaron porcentajes de polimorfismo entre 58.33 % y 100 %, con una media de 81.2 %, mientras que el polimorfismo de los ISSR osciló entre 80 y 100 %, con un promedio de 90 %.

Cuadro 14. Iniciadores seleccionados para el análisis de poblaciones.

Iniciador	Secuencia	PA	No. BM	No. BP	%P
<b>RAPD's</b>					
<b>OPA 09</b>	5'-GGGTAACGCC-3'	12	5	7	58.33
<b>OPA 17</b>	5'-GACCGCTTGT-3'	4	2	2	50.00
<b>OPA 19</b>	5'-CAAACGTCCG-3'	10	0	10	100.00
<b>OPA 20</b>	5'-GTTGCGATCC-3'	7	0	7	100.00
<b>OPD 05</b>	5'-TGAGCGGACA-3'	10	1	9	90.00
<b>OPD 18</b>	5'-GAGAGCCAAC-3'	9	1	8	88.89
<b>Promedio</b>		52	9	43	<b>81.2</b>
<b>ISSR</b>					
<b>A1</b>	5'-ACACACACACACACT-3'	14	2	12	85.71
<b>A2</b>	5'-CCGCCGCCGCCGCCG-3'	9	0	9	100.00
<b>IAH 03</b>	5'-GAGAGAGAGAGACC-3'	16	1	15	93.75
<b>IAH 04</b>	5'-CACCACCACGC-3'	10	2	8	80.00
<b>RAH 04</b>	5'-AAAGCTGCGG-3'	14	2	12	85.71
<b>P1</b>	5'-GAGCAACAACAACAACA-3'	14	0	14	100.00
<b>Promedio</b>		77	7	70	<b>90.9</b>

Los iniciadores utilizados arrojaron patrones de bandeo definidos donde se observaron diferencias intra e interpopulacionales (Figuras 19 y 20).

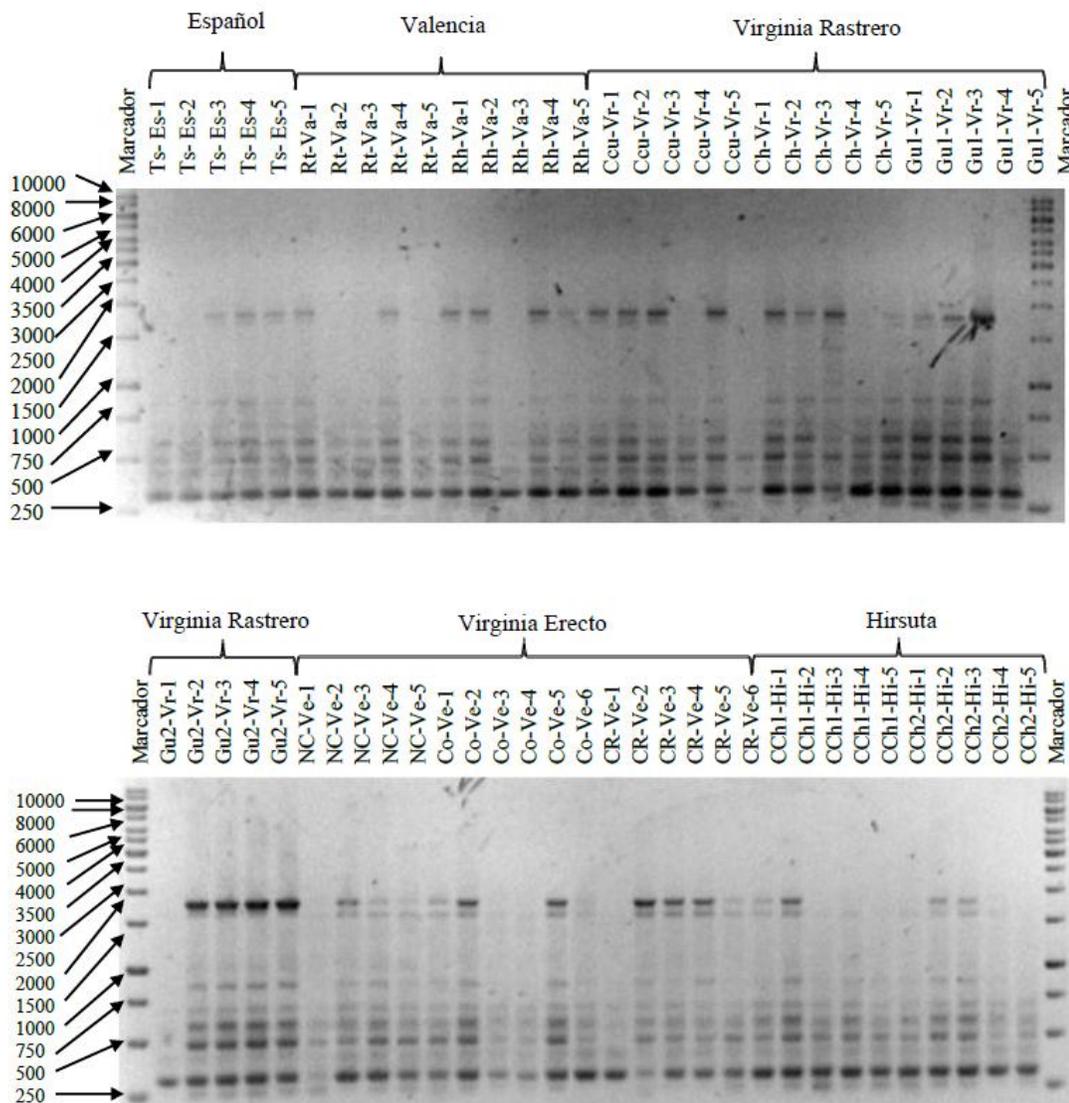


Figura 19. Patrones de bandeo RAPD de los genotipos de *Arachis* evaluados con el iniciador D05, para el análisis de poblaciones.

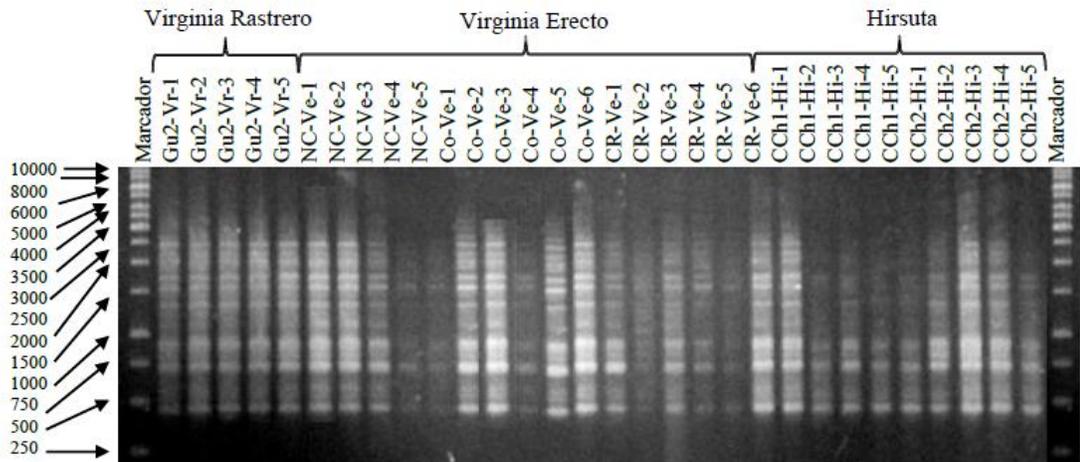
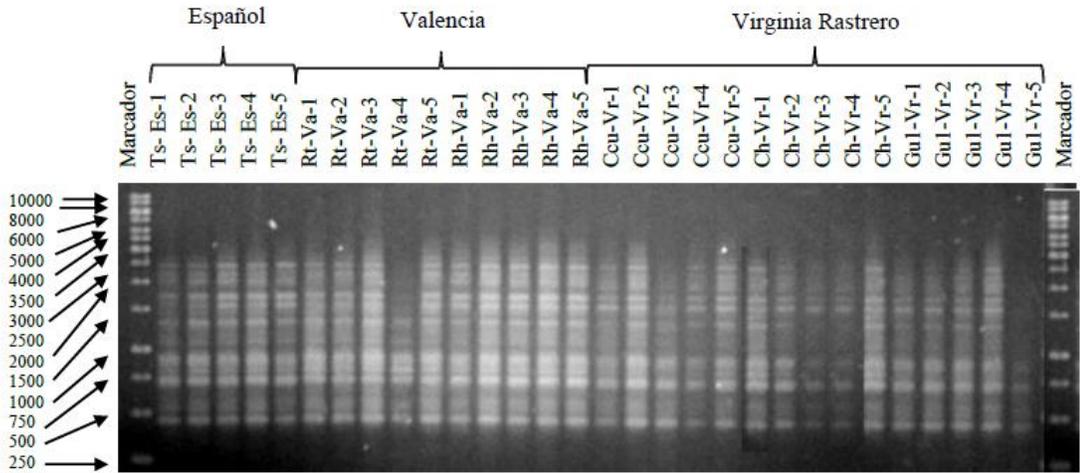


Figura 20. Patrones de bandeo ISSR de los genotipos de *Arachis* evaluados con el iniciador A1, para el análisis de poblaciones.

Los datos obtenidos con los iniciadores RAPDs e ISSRs se unieron para realizar el análisis de las poblaciones.

En el Cuadro 15 se presentan los valores de identidad (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) entre las 12 poblaciones evaluadas.

Cuadro 15. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y valores de distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para las 12 poblaciones de cacahuate.

Variedad	Ts- Es	Rt- Va	Rh- Va	Ccu- Vr	Ch- Vr	Gu1- Vr	Gu2- Vr	NC- Ve	Co- Ve	CR- Ve	Cch1- Hi	Cch2- Hi
<b>Ts-Es</b>	****	<b>0.85</b>	0.89	0.87	0.81	0.81	0.76	0.84	0.77	0.81	0.81	0.81
<b>Rt-Va</b>	0.16	****	<b>0.90</b>	0.83	0.78	0.76	0.78	0.82	<b>0.74</b>	<b>0.74</b>	0.79	0.79
<b>Rh-Va</b>	0.12	0.10	****	0.85	0.82	0.82	0.83	0.82	0.80	0.78	0.81	0.81
<b>Ccu-Vr</b>	0.14	0.18	0.16	****	0.89	0.84	0.75	0.83	0.85	0.84	0.85	0.83
<b>Ch-Vr</b>	0.21	0.25	0.19	0.12	****	0.86	0.80	0.86	0.89	0.87	0.82	0.83
<b>Gu1-Vr</b>	0.22	0.28	0.20	0.17	0.15	****	0.78	0.82	0.86	0.84	0.85	0.85
<b>Gu2-Vr</b>	0.28	0.25	0.19	0.28	0.22	0.25	****	0.81	0.80	0.75	0.77	0.84
<b>NC-Ve</b>	0.17	0.20	0.20	0.18	0.15	0.20	0.21	****	0.80	0.85	0.86	0.87
<b>Co-Ve</b>	0.26	0.30	0.22	0.16	0.12	0.15	0.22	0.22	****	0.87	0.82	0.82
<b>CR-Ve</b>	0.21	0.30	0.25	0.17	0.14	0.17	0.29	0.17	0.13	****	0.84	0.84
<b>Cch1-Hi</b>	0.21	0.24	0.22	0.16	0.19	0.16	0.26	0.15	0.20	0.18	****	<b>0.92</b>
<b>Cch2-Hi</b>	0.21	0.24	0.21	0.19	0.18	0.16	0.17	0.14	0.20	0.18	0.09	****

Las poblaciones más relacionadas fueron las dos accesiones de la raza Hirsuta Criollo chino 1 y Criollo chino 2 (con un valor de identidad de 0.92); las de la raza Valencia *A. hypogaea* Rojo de Huazulco y Rojo de Tlaltenango (con un valor de identidad de 0.90) y *A. hypogaea* Rojo de Tlaltenango y Tersal (raza español), con un valor de identidad de 0.89.

Las poblaciones menos relacionadas genéticamente fueron *A. hypogaea* Rojo de Tlaltenango (raza Valencia) y *A. hypogaea* Criollo de Ocozocuahtla (Virginia erecto) (0.74); *A. hypogaea* Rojo de Tlaltenango y *A. hypogaea* CROC-10

(Virginia erecto) y *A. hypogaea* De Guia 2 (Virginia rastrero) y *A. hypogaea* CROC-10 (0.74).

Los valores de identidad entre todas las poblaciones estuvieron en un rango entre 0.74 y 0.92 (Cuadro 15).

Al evaluar parámetros que definen la estructura de las poblaciones (Cuadro 16) se encontró diferencias entre las poblaciones en relación al grado de polimorfismo entre sus individuos. Las poblaciones que mostraron el mayor porcentaje de *loci* polimórficos fueron *A. hypogaea* NC17-UACH, Criollo de Ocozocuautila y Rojo de Huazulco, con valores de 51.16, 45.74 y 44.19 %, respectivamente.

En contraste, la población con menor polimorfismo entre sus individuos fue *A. hypogaea* De Guia 2, con un valor de 27.13 %. Además, el polimorfismo entre todas las poblaciones fue de 88.37 %.

Cuadro 16. Variabilidad genética entre y dentro de poblaciones de *Arachis*, con base en los patrones RAPD e ISSR.

Pob	LP	LP(%)	Na	DE	Ne	DE	h	DE	I	DE	Gst	Nm
Ts-Es	48	37.21	1.3721	0.4852	1.3160	0.4270	0.1682	0.2240	0.2388	0.3157		
Rt-Va	45	34.88	1.3488	0.4785	1.2168	0.3474	0.1255	0.1877	0.1873	0.2709		
Rh-Va	57	44.19	1.4419	0.4985	1.3679	0.4388	0.1967	0.2282	0.2802	0.3218		
Ccu-Vr	59	45.74	1.4574	0.5001	1.2897	0.3731	0.1678	0.2004	0.2497	0.2883		
Ch-Vr	54	41.86	1.4186	0.4953	1.2887	0.3965	0.1610	0.2080	0.2362	0.2954		
Gu1-Vr	55	42.64	1.4264	0.4965	1.3315	0.4242	0.1796	0.2207	0.2586	0.3117		
Gu2-Vr	35	27.13	1.2713	0.4464	1.2284	0.3962	0.1207	0.2045	0.1717	0.2878		
NC-Ve	66	51.16	1.5116	0.5018	1.3457	0.3987	0.1956	0.2105	0.2879	0.2994		
Co-Ve	45	34.88	1.3488	0.4785	1.1945	0.3318	0.1145	0.1776	0.1740	0.2571		
CR-Ve	48	37.21	1.3721	0.4852	1.2615	0.3825	0.1466	0.2035	0.2145	0.2908		
Cch1-Hi	54	41.86	1.4186	0.4953	1.2895	0.3805	0.1649	0.2056	0.2419	0.2956		
Cch2-Hi	44	34.11	1.3411	0.4759	1.2587	0.3883	0.1425	0.2069	0.2060	0.2947		
EP	114	88.37	1.8837	0.3218	1.4978	0.3489	0.2931	0.1727	0.4418	0.2320	<b>0.4644</b>	<b>0.5767</b>

Pob= Población, LP= Loci polimórficos, LP(%)= Porcentaje de loci polimórficos, Na= Número de alelos observados, DE= Desviación estándar, Ne= Número de alelos efectivos, h= Diversidad genética de Nei, I= Índice de diversidad de Shannon, Gst= Coeficiente de diferenciación entre poblaciones, Nm= Número de individuos migrante, EP= Entre Poblaciones.

Otro dato importante mostrado en el Cuadro 16, es la estimación del número de individuos migrantes, relacionado con el grado de flujo genético ( $Nm = 0.58$ ), que indica que hay menos de un individuo migrante entre las poblaciones, lo cual concuerda con el tipo de polinización autogama que presenta *Arachis*, con un porcentaje de autofecundación del 97 % (Martínez, 2007), las variaciones en los porcentajes de flujo de genes están en función directa con la anatomía de la planta, barreras geográficas, expresión genética, interacción ambiental e interacción genotipo-ambiente. El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue  $G_{st} = 0.4644$  (46.5 %), lo que indica que las poblaciones están medianamente diferenciadas. Ello establece también que aproximadamente 46.5 % de la variación detectada se debe a diferencias entre las poblaciones. El resto (53.5 %) representa diversidad genética dentro de las mismas.

El análisis de poblaciones mostró que los materiales con mayor variabilidad genética fueron *A. hypogaea* NC17-UACH, Criollo de Ocozocuautila y Rojo de Huazulco; lo que indica que estas accesiones muestran un alto potencial para contener alelos de interés para establecer programas de mejoramiento genético para esta especie y sus respectivas razas.

En la Figura 21 se observa el dendrograma obtenido al considerar los individuos estudiados en cada accesión. Obteniendo la formación de tres grandes grupos: El Grupo I conformado por la accesión Tersal (raza Español) y las dos variedades de la Raza Valencia (Rojo de Tlalquitenango, y Rojo de Huazulco). El Grupo II que incluyó a los dos materiales de la raza Hirsuta y la mayoría de

los materiales de la raza Virginia, excepto la accesión De Guia 2, que es la que conformó el Grupo III.

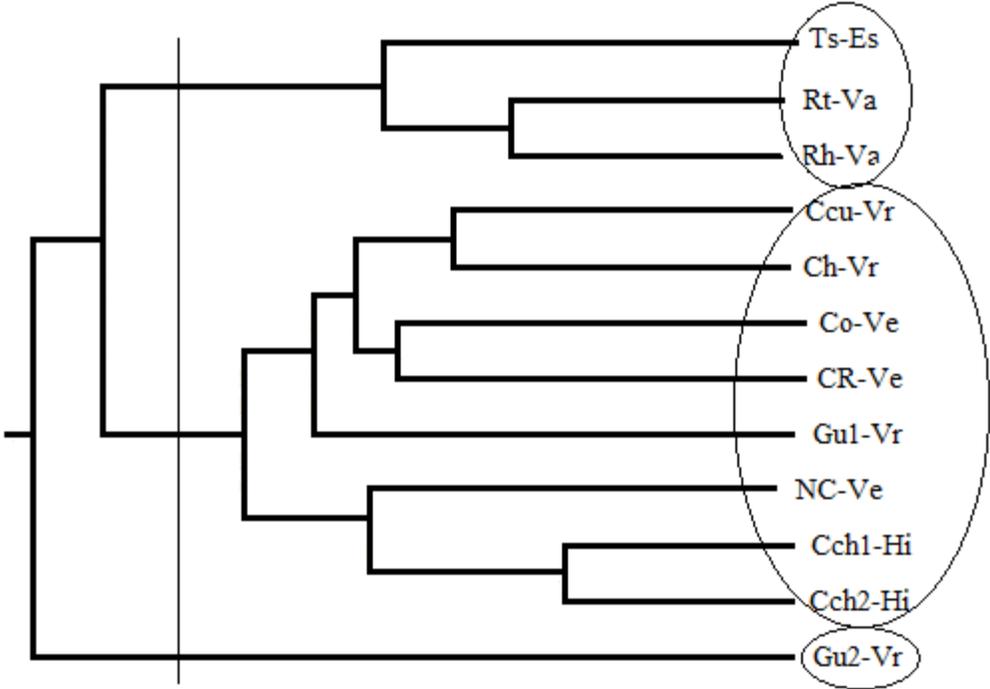


Figura 21. Dendrograma obtenido con la matriz poblacional.

## 7.5 CONCLUSIONES PARTICULARES

1. En *Arachis hypogaea* L. la mayor parte de la diversidad genética detectable se encuentra dentro de las poblaciones y en menor proporción entre ellas.
2. Las 12 variedades de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) estudiadas se encuentran poco diferenciadas entre sí.
3. Las variedades con mayor diversidad genética fueron *A. hypogaea* NC17-UACH, *A. hypogaea* Criollo de Ocozocuatla y *A. hypogaea* Rojo de Huazulco, mientras que *Arachis hypogaea* De Guia 2 presentó la menor diversidad genética.
4. Las poblaciones más relacionadas fueron Hirsuta Criollo chino 1 y Criollo chino 2, y las menos relacionadas *A. hypogaea* Rojo de Tlaltenango (raza Valencia) y *A. hypogaea* Criollo de Ocozocuatla.

## VIII. ETAPA 3: RESPUESTAS MORFOGÉNICAS EN CULTIVO *in vitro*

### 8.1 INTRODUCCIÓN

El uso de los reguladores de crecimiento *in vitro* ha sido reconocido como de suma importancia tanto para la regeneración de plantas a partir de sus principales respuestas morfogénicas asociadas a la organogenesis y la embriogénesis somática. En cacahuate, se han evaluado para promover el crecimiento de plantas valiosas genéticamente manteniendo tanto sus rendimientos y contenido de aceite así como de ácidos grasos. Esta especie tiende a ser un cultivo difícil para ser manipulado *in vitro* y solo se tiene registro de limitados sucesos de regeneración de plantas que han sido documentados en algunos cultivares. La regeneración de plantas ha sido reportada a partir del uso de diferentes explantes a partir de la organogenesis y embriogenesis somática. Las respuestas *in vitro* en cacahuate, han resultado específicas de acuerdo al genotipo para su regeneración *in vitro*. Esto es porque la multiplicación y mantenimiento de la especie en condiciones *in vitro* requiere protocolos específicos para cada tipo. La estandarización de protocolos de regeneración vegetativa *in vitro* en que se puede considerar que puede coadyuvar acertadamente a la propagación masiva de diversos cultivares de cacahuate (Verma et al., 2009).

La regeneración de plantas *in vitro* dentro de un sistema de cultivo, es el paso más crítico en la implementación de varias estrategias tanto para la obtención de plantas, su multiplicación, así como en la implementación de diversas estrategias incorporadas en los programas de mejoramiento genético de

diversos cultivos. La técnica de cultivo de tejidos ha sido explotada extensivamente para estudiar el potencial morfogénico de órganos, tejidos y células cultivados *in vitro* (Tyagi *et al.*, 1993).

La regeneración de tejidos cultivados de cacahuete se realiza en baja frecuencia. El interés particular alrededor del género *Arachis* es que ocupa un lugar importante como fuente de aceite vegetal a nivel mundial. Sin embargo, además de ser un cultivo de aceite redituable, también es rico en proteína altamente nutritiva fácilmente disponible (Tyagi *et al.*, 1993). Adicionalmente, su mejor cualidad es una excelente resistencia a factores de estrés bióticos y abióticos. Sin embargo, a pesar de ser cultivado en extensas áreas de cultivo su registro de productividad es bajo. Por esta razón, hay un considerable interés en el desarrollo de técnicas de cultivo para esta especie (Verma *et al.*, 2009). Este es el fundamento para diseñar e implementar investigaciones en la regeneración de plantas de *Arachis hypogaea* L. (Tyagi *et al.*, 1993).

## 8.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar las condiciones del cultivo *in vitro* que permitan la obtención y propagación de plantas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.).
- Evaluar y comparar las respuestas morfogénicas *in vitro* obtenidas con cuatro razas de *A. hypogaea* L. cultivadas en México, diferentes explantes y distintas concentraciones de reguladores de crecimiento.

### 8.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Cuatro razas de *Arachis hypogaea* L. cultivadas en México fueron evaluadas bajo condiciones de cultivo *in vitro* (Cuadro 17). El experimento involucró las respuestas *in vitro* de cinco explantes distintos (hoja, tallo, cotiledón, nudo y yema) y también se definieron tipos y concentraciones de reguladores de crecimiento (Cuadros 18 a y b). Con estos factores se diseñaron, establecieron y evaluaron cuatro ensayos: dos para inducción de callos y dos para la regeneración de brotes.

Cuadro 17. Materiales de cacahuete utilizados en la evaluación morfogénica de *A. hypogaea*.

<b>Siglas</b>	<b>Variedad</b>	<b>Tipo de Raza</b>	<b>TC</b>	<b>Origen</b>	<b>AC</b>
Ts-Es	Tersal	Español	E	Edo. México	2010
Rh-Va	Rojo de Huazulco	Valencia	E	Morelos	2010
Ch-Vr	Criollo de Huitzuco	Virginia	R	Guerrero	2010
Cch1-Hi	Criollo Chino1	Hirsuta	R	Puebla	2011

TC= tipo de crecimiento: E= erecto, R= rastrero. AC= Año de colecta.

#### **Proceso de Desinfestación de Explantes**

Para obtener explantes limpios (sanos), cinco semillas de cada variedad se lavaron con agua corriente, luego se dejaron remojar por 5 min y se eliminó el tegumento seminal. En seguida, se separaron los cotiledones y se seleccionaron aquellos que contenían el embrión. Estos se lavaron nuevamente con agua corriente tres veces y se llevaron a una campana de flujo laminar donde se colocaron en alcohol al 70 % (v/v) durante 30 segundos, para transferirse después a una solución de Tween-20 al 10 % (v/v) y cloro al 10 % (v/v) durante 10 min, luego se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se

propagaron en un medio MS (Murashige y Skoog, 1962). Después de una semana se tuvo la formación de plántulas sanas desarrolladas (Figura 22).

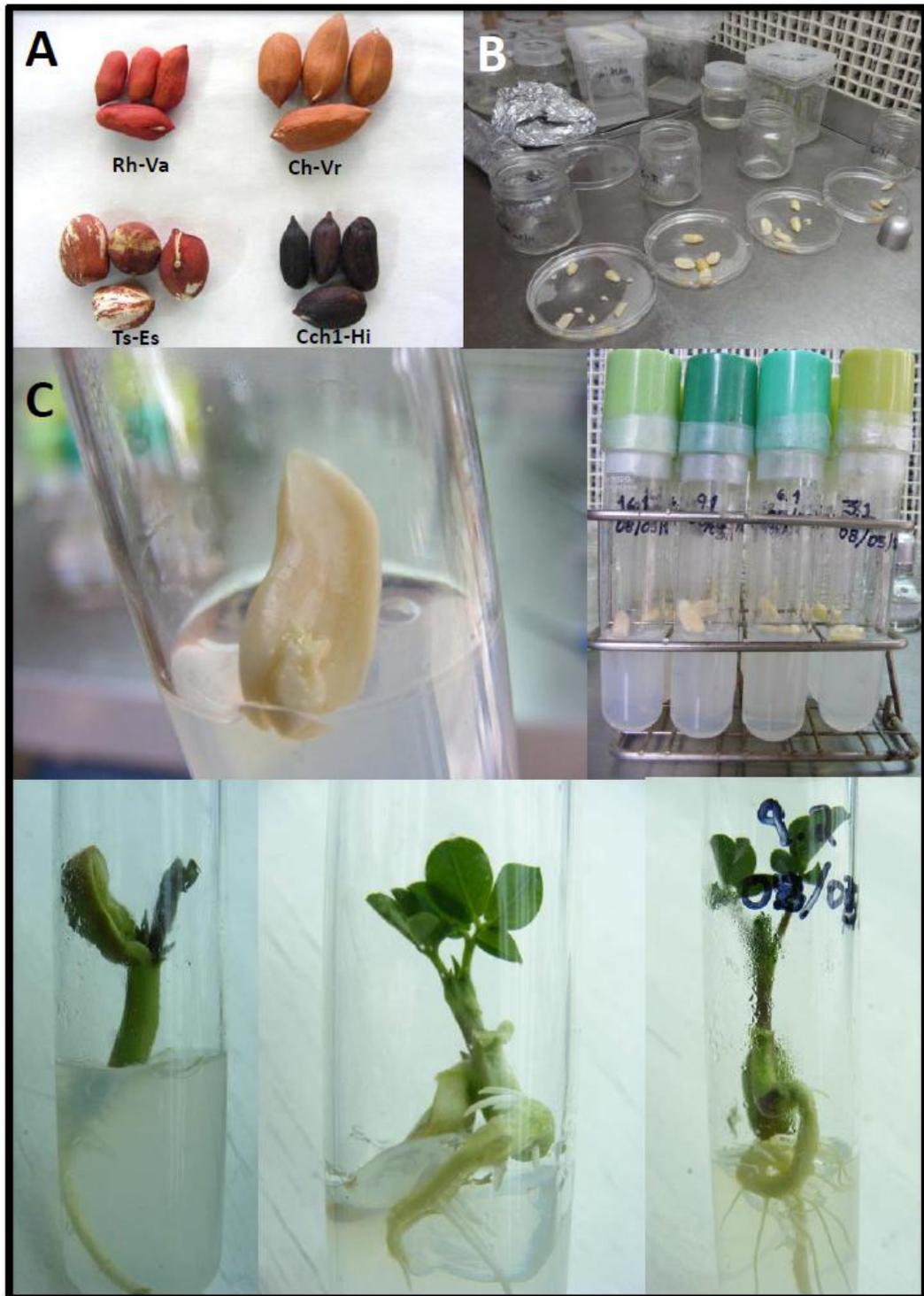


Figura 22. A) Variabilidad de semillas utilizadas, B) Proceso de desinfección de semilla y C) Crecimiento y desarrollo de plantas sanas bajo cultivo *in vitro*.

## Fase de Inducción de Callos

Con las plantas madre sanas de cada variedad se procedió a extraer los explantes de hoja, tallo, nudo, cotiledón y yema, todos con un tamaño aproximado de 3 a 4 mm. Estos explantes fueron cultivados en un medio formulado con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y con las concentraciones de 0, 1, 2 y 4 mgL<sup>-1</sup> de la hormona 2,4-D (Cuadro 18a).

Cuadro 18a. Tratamientos para la inducción de callos establecidos en los ensayos 1 y 2.

NE	NT	Variedades	Explantes	Concentración de 2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	Rep
E1	80	Ts-Es Rh-Va Ch-Vr Cch1-Hi	Hoja, tallo, nudo, cotiledón y yema	Control 1 mgL <sup>-1</sup> 2 mgL <sup>-1</sup> 4 mgL <sup>-1</sup>	3
E2	16	Ts-Es Rh-Va	Hoja, tallo, cotiledón y yema	Control 4 mgL <sup>-1</sup>	3

NE= Número del ensayo, NT= Número de tratamientos y Rep= Repeticiones.

Las variables respuesta evaluadas fueron:

- Porcentaje de formación de callo en el explante: se determinó con el porcentaje de explante cubierto por callo, obteniéndose la clasificación: ausencia, 33 %, 66 % y 100 % de callo en la muestra.
- Color de callo: se consideró la siguiente clasificación: 1= color verde, 2= color blanco y 3= color café.
- Consistencia de callo: se clasificó como 1= friable y 2= compacto.
- Presencia de brotación: se estableció como 0= ausencia y 1= presencia.

### Fase de Regeneración de Brotes

Los explantes que formaron callos se cultivaron de 4 a 6 semanas, dependiendo de que “tan prolífico” fue su crecimiento, una vez formados se transfirieron a un medio de inducción de brotes a base de sales MS (Murashige y Skoog, 1962) y diferentes concentraciones de la hormona benciladenina BA (Cuadro 18b). Hecho esto, se dejaron transcurrir de 4 a 6 semanas para obtener la formación de brotes.

Cuadro 19b. Tratamientos para la regeneración de brotes establecidos en los ensayos 3 y 4.

NE	NT	Variedades	Explantes	Concentración		Rep
				2,4- D (mgL <sup>-1</sup> )	BA (mgL <sup>-1</sup> )	
E3	320	Ts-Es	Hoja,tallo, nudo, cotiledón y yema	Control	Control	3
		Rh-Va		1 mgL <sup>-1</sup>	1.5 mgL <sup>-1</sup>	
		Ch-Vr		2 mgL <sup>-1</sup>	2.5 mgL <sup>-1</sup>	
		Cch1-Hi		4 mgL <sup>-1</sup>	3.5 mgL <sup>-1</sup>	
E4	48	Ts-Es	Hoja,tallo, cotiledón y yema	Control	Control	3
		Rh-Va		4 mgL <sup>-1</sup>	2.5 mgL <sup>-1</sup> 3.5 mgL <sup>-1</sup>	

NE= Número del ensayo, NT= Número de tratamientos y Rep= Repetición.

### Análisis Estadístico de los Datos

Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) utilizando el programa estadístico SAS 9.0 (SAS Inst., Inc., 2002). Se hizo una comparación de medias utilizando la prueba de Duncan (Duncan's Multiple Range Test, DMRT), con el procedimiento de modelo lineal general ( $\alpha \leq 0.05$ ) de SAS.

## 8.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Proceso de Desinfestación de Explantes

El método de siembra de semillas en medio de cultivo *in vitro* favoreció la obtención de plantas de calidad y libres de patógenos, además de promover una rápida regeneración de los tejidos vegetales cultivados.

### Inducción de Callos

Los explantes hoja, tallo, nudo, cotiledón y yema provenientes de cuatro genotipos (razas) de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) mostraron formación de callo cuando el medio de cultivo MS fue suplementado con diferentes concentraciones del regulador de crecimiento 2,4-D.

Los resultados del análisis de varianza para concentraciones de 2,4-D, variedades y tipos de explante muestran efectos significativos ( $\alpha < 0.05$ ) en la inducción de callos (Cuadro 19). El tipo de explante, la concentración de 2,4-D y la interacción entre ellos, fueron las fuentes de variación que influyeron significativamente en todas las variables medidas (porcentaje de formación de callo en el explante, color y consistencia del callo y desarrollo de brotes). Por el contrario, el tipo de variedad sólo mostró un efecto significativo en la consistencia y formación del callo; esta última variable también fue afectada por la interacción entre la variedad y la concentración. Por último, la interacción de los tres factores (variedad, tipo de explante y concentración) sólo influyó significativamente en la variable presencia de brotes (Cuadro 19).

Cuadro 20 Niveles de significancia en la influencia de diferentes explantes, cultivares y concentraciones de 2,4-D en la inducción de callos de *A. hypogaea* L. cultivados in vitro.

Fuente de variación	Variables			
	CM (%)	Co	Cn	Br
Variedad	0.0010	0.2040	0.0013	0.2655
Tipo de explante	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Concentración	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
Variedad*Explante	<0.0001	0.1993	<0.0001	0.0932
Variedad*Concentración	0.0269	0.6259	0.1531	0.1109
Explante*Concentración	<0.0001	0.0015	<0.0001	<0.0001
Variedad*Explante*Concentración	0.2351	0.1358	0.1549	0.0181

CM= Porcentaje de formación de callo en el explante, Co= Color de callo, Cn= Consistencia de callo, Br= Presencia de brotación.

Los tratamientos para la inducción de callos (Cuadro 18a) tuvieron un efecto significativo sobre la inducción de callos ( $\alpha \leq 0.05$ ) a las seis semanas de establecida la siembra (Cuadro 20).

Los mejores crecimientos de callo fueron obtenidos con las concentraciones de 4 y 2 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D, estos resultados coinciden con lo reportado por Alam *et al.* (2010), quienes mencionan que el mejor crecimiento de callos fue obtenido cuando al medio de cultivo fue suplementado con 2 mg/L de 2,4-D. Adicionalmente, la más alta proliferación de callos se obtuvo con los explantes yema, hoja y tallo (Cuadro 20). Las variedades que mostraron la inducción más alta de callos fueron 'Rojo de Huazulco' de la raza Valencia (Rh-Va) y 'Tersal' de la raza Español (Ts-Es) (Cuadro 20).

Cuadro 21. Efecto de diferentes tipos de explantes, cultivares y concentraciones de 2,4-D en las características de callos de *A. hypogaea* L. cultivados *in vitro*.

Fuente de variación	Variables			
	CM (%)	Co	Cn	Br
<i>Concentración 2,4-D (mgL<sup>-1</sup>)</i>				
0	22.44 b	1.48 c	0.55 b	0.20 a
1	56.76 a	2.90 b	0.87 a	0.05 b
2	55.11 a	3.13 b	0.85 a	0.01 b
4	64.35 a	3.98 a	0.93 a	0.03 b
<i>Tipo de explante</i>				
Hoja	62.04 a	2.79 b	0.83 a	0.00 b
Cotiledón	26.73 c	1.13 c	0.46 b	0.00 b
Nudo	48.84 b	3.25 ab	0.90 a	0.04 b
Tallo	59.73 ab	3.94 a	0.96 a	0.02 b
Yema	50.84 ab	3.27 ab	0.85 a	0.31 a
<i>Variedad</i>				
Ts-Es	51.81 ab	2.70 a	0.77 b	0.07 b
Rh-Va	57.09 a	3.27 a	0.92 a	0.12 b
Ch-Vr	46.20 b	2.77 a	0.72 b	0.05 b
Cch1-Hi	43.56 b	2.77 a	0.80 ab	0.07 b

En la misma columna, valores con la misma letra, son significativamente iguales (DMRT  $\alpha \leq 0.05$ ). CM= Porcentaje de formación de callo en el explante, Co= Color de callo, Cn= Consistencia de callo, Br= Presencia de brotación.

Considerando estos resultados y los mejores tratamientos, se diseñó y evaluó el ensayo 2 de inducción de callos (Cuadro 18a).

Los resultados obtenidos a cuatro semanas de su siembra revelaron que el tipo de explante utilizado y la interacción entre la variedad y el explante influyeron significativamente en las respuestas morfogénicas para callogénesis, sin embargo el tipo de variedad no mostró diferencias significativas (Anexo 6).

Los explantes yema y hoja mostraron la mejor respuesta a formación de callo, mientras que tallo mostró la inducción más baja para la raza Valencia (Rh-Va) y cotiledón para la raza Español (Ts-Es) (Cuadro 21) (Figura 23).

Cuadro 22. Efecto de 2,4-D en la inducción de callos en cuatro genotipos de *Arachis*.

Concentración de 2,4-D	Explante	Variedad	Variables de callo			
			Naturaleza	Color	Textura	Diametro (cm)
4 mg/L	Cotiledón	Ts-Es	+++	Verde	F	0.5
		Rh-Va	+++	Café	F	1.6
	Hoja	Ts-Es	+++	Verde	F	2.1
		Rh-Va	++	Blanco	F	0.6
	Yema	Ts-Es	+++	Verde	F	1.0
		Rh-Va	++	Blanco	F	1.7
	Tallo	Ts-Es	+++	Blanco	F	1.7
		Rh-Va	+++	Blanco	F	0.6

'+' Callo pobre, '++' Buen callo, '+++´ Excelente callo; F= Friable.

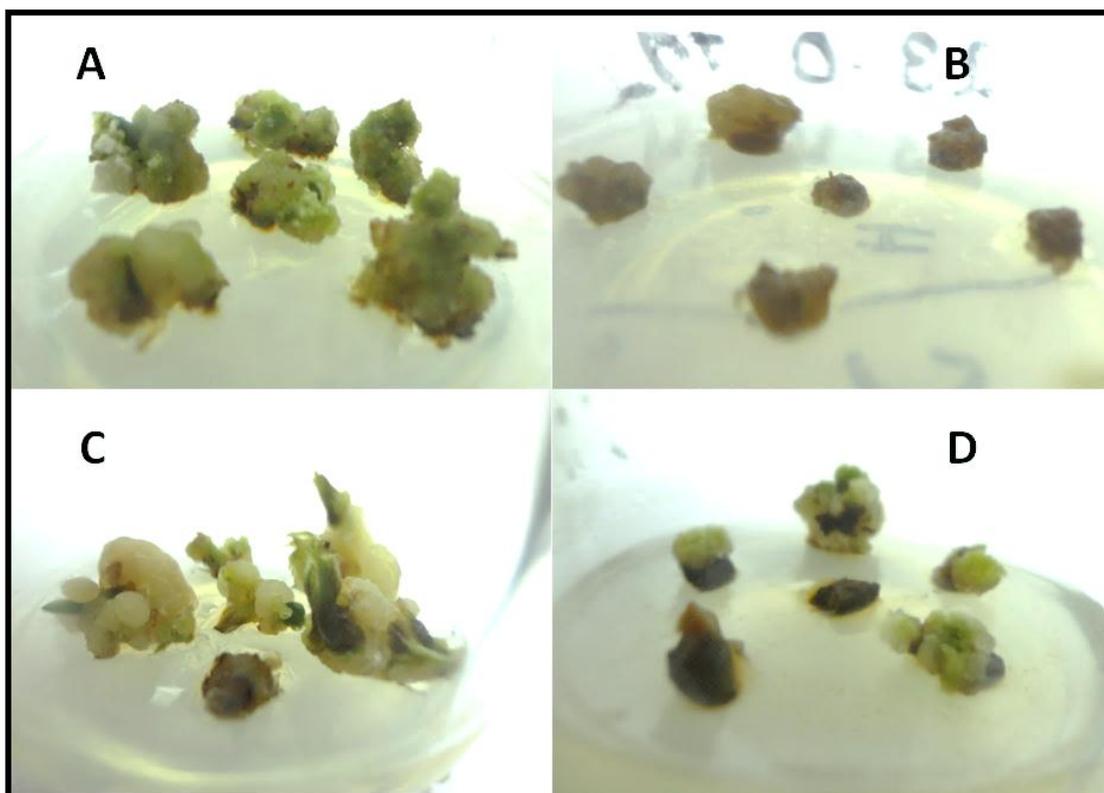


Figura 23. Formación de callo de *A. hypogaea* L. en: A) Hoja, B) Tallo, C) Yema y D) Cotiledón.

## Regeneración de Brotes

Los tratamientos utilizados (Cuadro 18b) tuvieron un efecto significativo sobre la regeneración de brotes (Figura 24), pues los ensayos indican que el tipo de explante y la interacción entre la variedad y el explante tienen un efecto significativo sobre el número de brotes generados ( $\alpha=0.05$ ) a partir del cultivo de callos, mientras que la altura de brote se ve influenciada por el tipo de explante, la concentración de BA y la interacción entre estos (Cuadro 22).

Cuadro 23. Niveles de significancia en la influencia de diferentes explantes, cultivares y concentraciones de BA en la regeneración de brotes de *A. hypogaea* L. cultivados *in vitro*.

Fuente de variación	Variables de Brotación	
	No.	AB
Variedad	0.0832	0.7759
Tipo de explante	<0.0001	0.0110
Concentración	1.0000	<0.0001
Variedad*Explante	0.0364	0.6904
Variedad*Concentración	1.0000	0.9691
Explante*Concentración	1.0000	0.0007
Variedad*Explante*Concentración	1.0000	0.9214

No.= Número, AB= Altura de brote.

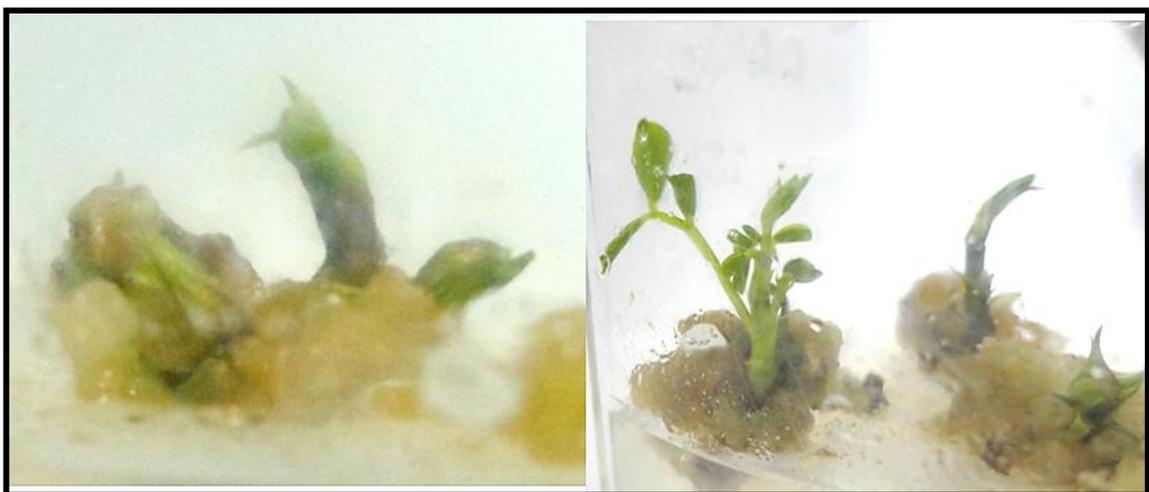


Figura 24. Regeneración de brotes en *Arachis hypogaea* L. utilizando el explante yema a una concentración de  $2.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BA.

El mayor número de brotes generados se registró a una concentración de 2.5 mg/L. Resultados similares observaron Alam *et al.* (2010) quienes informan que altas concentraciones de BA (de 2 a 2.5 mg/L) promueven directamente la brotación. Adicionalmente, la respuesta a regeneración de brotes se obtuvo con el uso del explante yema y no se obtuvieron diferencias significativas por el uso de distintas variedades (Cuadro 23).

Cuadro 24. Respuesta de BA en callogénesis y brotación, en accesiones de las razas Español y Valencia.

BA (mg/mL)	Explante	Var	Callos			Brotos			
			Color	Te	Diámetro	No.	Clasif	Altura	
2.5	Cotiledón	Ts-Es	Verde	F	0.67	0	0	0	
		Rh-Va	Verde	F	1.83	0	0	0	
	Yema	Ts-Es	Blanco	F	2.40	3	2	1.9	
		Rh-Va	Blanco	F	1.80	1	1	0.8	
	Hoja	Ts-Es	Blanco	F	1.63	0	0	0	
		Rh-Va	Blanco	F	1.57	0	0	0	
	Tallo	Ts-Es	Verde	F	0.87	0	0	0	
		Rh-Va	Verde	F	0.93	0	0	0	
	3.5	Cotiledón	Ts-Es	Blanco	C	0.60	0	0	0
			Rh-Va	Blanco	F	0.97	0	0	0
Yema		Ts-Es	Café	F	1.77	0	0	0	
		Rh-Va	Café	F	1.53	2	1	3.3	
Hoja		Ts-Es	Blanco	F	1.56	0	0	0	
		Rh-Va	Blanco	F	1.44	0	0	0	
Tallo		Ts-Es	Verde	F	0.98	0	0	0	
		Rh-Va	Verde	F	0.92	0	0	0	

Var= variedad, Te= Textura: F= Friable, C= Compacto.

## 8.5 CONCLUSIONES PARTICULARES

El tipo de explante, el genotipo y el medio de cultivo (tipo y concentración de hormona utilizada) influyen en las respuestas morfogénicas *in vitro* de *Arachis hypogaea* L.

Las mejores respuestas en la formación de callos y brotes se obtuvieron con una concentración de  $4 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D y  $2.5 \text{ mgL}^{-1}$  de BA, respectivamente.

Los explantes yema y hoja mostraron mejores respuestas en la formación de callos y brotes.

Las variedades 'Rojo de Huazulco' de la raza Valencia (Rh-Va) y 'Tersal' de la raza Español (Ts-Es) promovieron mejores respuestas morfogénicas.

## IX. CONCLUSIONES GENERALES

1. Existe variabilidad genética dentro y entre los 12 materiales de *Arachis hypogaea* L., evaluados.
2. Se observaron diferencias significativas en la agrupación y discriminación de variedades de cacahuate al utilizar marcadores morfológicos, RAPD e ISSR.
3. Mediante el uso de similitudes y distancias genéticas se obtuvieron diversas agrupaciones de razas de *A. hypogaea* L., destacándose una alta similitud entre *A. hypogaea* Español y *A. hypogaea* Valencia, siendo *A. hypogaea* Hirsuta la raza más distante genéticamente respecto al resto.
4. La caracterización morfológica y molecular permitió el estudio de la diversidad genética de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.), además de constituir la base para el diseño y la implementación de posteriores programas de mejoramiento genético de la especie.
5. Se promovió callogenesis y regeneración de brotes *in vitro* para cuatro cultivares de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) cultivados en México.

## X. BIBLIOGRAFÍA

- Alam A. K. M. M. and Khalaque M. M. 2010. *In vitro* response of different explants on callus development and plant regeneration in groundnut (*Arachis hypogaeae* L.). *Int. J. Expt. Agric.* 1(1): 1-4.
- Azzam R. C.; Azer A. S.; Khaleifa A. M. M. and Abol-Ela F. M. 2007. Characterization of peanut mutants and molecular markers associated with resistance to pod rot diseases and aflatoxin contamination by RAPD and ISSR. *Arab. Journal Biotechnology* 10(2): 301-320.
- Azofeita D. A. 2006. Uso de marcadores moleculares en plantas; aplicaciones en frutales del trópico. *Agronomía Mesoamericana* 17(2): 221-242.
- Barbet T. 2006. La multiplicación de las plantas. *Viveros II Extra*. 33-38 p.
- Bassini A. 1976. Barley cultivar identification by use of isoenzyme electrophoretic patterns. *Canadian Journal Plant Science* 56:1-6.
- Becerra V. y Paredes M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de la diversidad genética. *Agricultura Técnica Chile* 60 (3): 270-281.
- Bergmann F.; Gregorius R. H. and Scholz F. 1989. Isoenzymes, indicators of environmental impacts on plants or environmentally stable gene markers. In: Scholz FG and DHR Rudin (Eds.). *Genetic Effects of Air Pollutants in Forest Tree Populations*. Springer-Verlag, Heidelberg. Germany. 201 p.
- Bornet B. and Branchard M. 2001. Nonanchored Inter Simple Sequence Repeat (ISSR) markers: reproducible and specific tools for genome fingerprinting. *Plant Molecular Biology Reporter* 19: 209-215.

- Burns J.; Yokota T.; Ashihara T.; Lean M.E.J. and Crozier A. 2002. Plant foods and herbal sources of resveratrol. *J. Agric. Food Chem.* 50: 3337-3340.
- Castillo A. 2001. Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo. Unidad de Biotecnología, INIA (Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria) Las Brujas, Argentina. [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf) (25/10/12).
- Castillo T. 1996. La biotecnología en la conservación y usos en la agrobiodiversidad. *INAP. Chile.* 6: 5-17.
- Cuc M. L.; Mace S. E.; Crouch H. J.; Quang D. V.; Long D. T. and Varshney K. R. 2008. Isolation and characterization of novel microsatellite markers and their application for diversity assessment in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea*). *BioMed. Central Plant Biology* 8: 55.
- Cucco F. M. and Rossi J. A. D. 2000. Protocol for regeneration *in vitro* of *Arachis hypogaea* L. *Electronic Journal of Biotechnology* 3(2): 154-160.
- Dellaporta S. L.; Wood J. and Hicks J. B. 1983. A plant DNA miniprep version II. *Plant Molecular Biology Reporter.* 18: 61-64.
- De Carvalho M. M.; Hopkings M.; Mitchell S.; Kresovich S.; Montenegro J. and Ferreira M. 2004. Genetic diversity of peanut (*Arachis hypogaea* L.) and its wild relatives based on the analysis of hypervariable regions of the genome. *BioMedic Center Plant Biology* 4: 11.
- De Viene D. 2003. Molecular markers in plant genetics and biotechnology. Science Publisher Inc. INRA. Francia. 248 p.

- Doyle J. J. and Doyle J. L. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Doyle J., J. and Doyle J., L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12: 12-14.
- Estopà M. 2005. El cultivo *in vitro* en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista Extra* 2005. Consultado el 19 de abril de 2010.
- Fontana M. L.; Mroginski L. A. and Rey H. Y. 2009. Organogenesis and plant regeneration of *Arachis villosa* Benth. (Leguminosae) through leaf culture. *Biocell. Argentina* 33(3): 179-186.
- Food Agriculture Organization (FAO). 2010. FAOSTAT. Producción/ Cultivos: Mundo (Lista)/ Maní (cacahuate) con cáscara/Área cosechada. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor> Consultado el 01 dde noviembre de 2012.
- Freitas F.; Moretzsohn M. and Valls J. 2007. Genetic variability of Brazilian Indian landraces of *Arachis hypogaea* L. *Genetics and Molecular Research* 6(3): 675-684.
- García E. 1988. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen (para adaptarlo a las condiciones de la Republica Mexicana). Quinta Edición. Offset Larios. México, D.F. 217 p.
- Henry R. J. 2001. Plant Genotyping. The DNA Fingerprinting of Plants. CABI Publishing. Wallingford, United Kingdom. 344 p.
- Huamán Z.; Williams J.T.; Salhuana W, and Vincent N. 1977. Descriptors for the cultivated potato and for the maintenance and distribution of germplasm

- collections. Consultative Group on International Agricultural Research. Rome, International Board for Plant Genetic Resources (I.B.P.G.R.). 47 p.
- Jayashree B.; Ferguson M.; Ilut D.; Doyle J. and Crouch J. H. 2005. Analysis of genomic sequences from peanut (*Arachis hypogaea*). Electronic Journal of Biotechnology (8)3: 226-237.
- Krapovickas A. and Gregory C. W. 1994. Taxonomía del género *Arachis* (Leguminosae). Bonplandia 8: 1-186.
- Lowe A.; Harris S. and Ashton P. 2004. Ecological Genetics, Design, Analysis, and Application. Ed. Blackwell Publishing. UK. 326 p.
- Marques C. C.; Moore W. C.; Valls M. J. F. and Karia T. C. 2007. Morphological traits as variety descriptors of *Arachis pintoi*. Crop Breeding and Applied Biotechnology 7: 278-286.
- Martínez M. A. 1999. Incremento, caracterización y clasificación de germoplasma de cacahuete chino (*Arachis hypogaea* subespecie *hypogaea*, variedad bótanica *Hirsuta*). Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 52 p.
- Matininez M. C. A. 2007. Caracterización de la variabilidad agromorfológica de cultivares de maní (*Arachis hypogaea* L.), en la región oriental de Guatemala. Tesis de Licenciatura, Universidad de San Carlos de Guatemala. 58 p.
- Mendoza H. A. y Simpson. J. 1996. Uso de marcadores moleculares en la agronomía. XV Aniversario de la Unidad Irapuato. Avances y perspectivas 16: 53-57.

- Mondal S.; Sutar R. and Badigannavar M. 2009. Assessment of genetic diversity in cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.) with differential responses to rust and late leaf spot using ISSR markers. *Indian Journal Genetic* 69(3): 219-224.
- Mora C. C. P. 2012. Manejo *in vitro* y caracterización molecular de Ahuehuete (*Taxodium mucronatum* Ten.). Tesis de Maestría. Departamento de Fitotecnia, UACH. Chapingo, México. 123 p.
- Nagaoka T. and Ogihara Y. 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.
- Ochse J. J. 1965. Cultivo y mejoramiento de plantas tropicales y subtropicales. Trad. por Alonso Blackaller Valdes. Volumen 2. México, Limusa. 1535 p.
- Olmos, S.; Luciani, G. y Galdeano, E. 2010. Parte V. Métodos de propagación y conservación de germoplasma. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. *In: Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). Buenos Aires, Argentina. 643 pp.
- Orihuela C. J. A. 1998. Evaluación de variedades de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.) de hábito erecto bajo condiciones de punta de riego en Mazatepec. Mor. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 120 p.
- Paredes M. and Gepts P. 1995. Extensive introgression of Middle American germplasm into Chilean common bean. *Genetic Resource and Crop Evolution* 42: 29-41.

- Patte H. E. and Stalker T. H. 1995. Germplasm Resources in *Arachis*. In: Advances in Peanut Science. APRES. United States of America. 614 p.
- Pérez E. 2009. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. Editorial Universidad Autónoma de Aguascalientes. Aguascalientes, México. 185 p.
- Piñero D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. En: Capital natural de México, vol. I : Conocimiento actual de la biodiversidad. Conabio, México. 437-494 p.
- Pittman Roy N. 1995. United States Peanut Descriptors. U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, ARS-132. 18 p.
- Raina S.; Rani V.; Kojima T.; Ogihara Y.; Singh K. and Devarumath R. 2001. RAPD and ISSR fingerprints as useful genetic markers for analysis of genetic diversity, varietal identification, and phylogenetic relationships in peanut (*Arachis hypogaea*) cultivars and wild species. Genome 44: 763–772.
- Saiki R. K.; Gelfand D. H.; Stoffel S.; Scharf S. J.; Higuchi R.; Horn G. T.; Mullis K. B.; Erlich H. A.. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239: 487-491.
- Salas P. M. A. 1985. Calidad fisiologica de semillas de cacahuete (*Arachis hypogaea* L.) bajo condiciones de almacenamiento rústico y refrigeración. Tesis Profesional. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México. 89 p.

- Sánchez D. S. 1992. Taxonomía, origen y dispersion del cacahuate *Arachis hypogaea* L. Universidad Autónoma Chapingo. Edo. De México, México. 26 p.
- Sánchez D. S.; Muñoz O. A.; González H. V. A. y Martínez G. A. 2006. Caracterización y clasificación de germoplasma mexicano de cacahuate (*Arachis hypogaea* L.). *Agrociencia* 40(002): 171-182.
- Semag K.; Bjørnstad Å. and Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *African Journal of Biotechnology* 5(25): 2540-2568.
- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2011. Agricultura. Producción Anual. Cierre de la producción agrícola por estado:Año Agrícola (OI + PV)/ Cacahuate/ Nacional/ Por estado/ Riego+Temporal/ Genérico/ Sup. Sembrada/ % Participación. [http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com\\_wrapper&view=wrapper&Itemid=351](http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=351). Consultado el 02 de noviembre de 2012.
- Staub J. E.; Serquen F. C.; Gupta M. 1996. Genetic markers, map construction and their applications in plant breeding. *Hort. Science* 31(5): 729-741.
- Tapia C. E. 2007. Caracterización de germoplasma de cítricos mediante marcadores morfológicos y moleculares. Tesis Doctoral. Fruticultura. Recursos genéticos y productividad. Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México, México. 98 p.
- Trigiano R. N.; Caetano A. G.; Brant J.; Bassam G. B. and Windham M. T. 1995. DNA amplification fingerprinting provides evidence that *Discula destructiva*,

- the cause of dogwood anthracnose in North America, is an introduced pathogen. *Mycología* 87(4): 490-500.
- Turner D. W. 2003. Método integral para estimar el área foliar total en los bananos. *InfoMusa* 12(2): 15-17.
- Tyagi V.; Sharma P. and Swarnkar P. L. 1993. Initiation of callus and differentiation of multiple shoots in *Arachis hypogaea* L. *Annals of Biology* 9(1): 34-37.
- Valadez M. E. 2006. Taller internacional sobre análisis genómico de plantas y hongos fitopatógenos. Departamento de Fitotecnia. UACH. Chapingo, México.
- Valadez M. E. y Kahl G. 2000. Huellas de ADN en genomas de plantas, teoría y protocolos de laboratorio. Mundi-Prensa. D.F., México. 147 p.
- Valadez M. E. y Kahl G. 2005. Huellas de ADN en genomas de plantas (Teorías y protocolos de laboratorio) Editorial Mundi-prensa. D.F., México. 147 p.
- Varshney K. R.; Bertoli J. D.; Moretzsohn C. M.; Vadez V.; Krishnamurthy L.; Aruna R.; Nigam N. S.; Moss J. B.; Seetha K.; Ravi K.; He G.; Knapp J. S. and Hoisington A. D. 2009. The first SSR-based genetic linkage map for cultivated groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Theory Application Genetic* 118: 729–739.
- Venkatachalam P.; Subramaniampillai A. and Jayabalan N. 1996. *In vitro* callus culture and plant regeneration from different explants of groundnut (*Arachis hypogaea* L.). *Breeding Science*. 4: 315-320.

Verma A.; Malik C. P.; Gupta V. K. and Sinsinwar Y. K. 2009. Response of Groundnut Varieties to Plant Growth Regulator (BAP) to Induce Direct Organogenesis. *World Journal of Agricultural Sciences* 5(3): 313-317.

Westman A. L. and Kresovich S. 1997. Use of molecular markers techniques for description of plant genetic variation. In: *Plant Genetic Resources: Conservation and Use*. Edited by: Callow JA, Ford-Lloyd BV, Newbury HJ, Wallingford. UK: CAB International, London. 9-48 p.

## XI. ANEXOS

**Anexo1.** Efecto de diferentes variedades de *Arachis hypogaea* L. sobre las variables respuesta morfológicas.

FUENTE DE VARIACIÓN	VARIEDAD									
	AP	AF	NH	CH	CSL	CSC	PC	LS	AS	RALS
<i>Variedad</i>										
Ts-Es1	24.7 a	256.8 d	15 ab	1 b	21.2 ab	24.4 c	77 b	2.3 a	1.4 b	0.6 b
Rt-Va2	15.8 c	117.8 f	9 c	2 a	24.1 ab	31.8 ab	45 d	1.8 a	1.1 bc	0.6 b
Rh-Va3	16.0 c	257.1 d	8 c	1 b	20.4 ab	24.7 c	39 e	1.9 a	1.1 bc	0.6 b
Ccu-Vr4	20.7 abc	305.3 a	17 a	1 b	18.6 b	30.7 ab	99 a	2.4 a	1.3b	0.9 b
Ch-Vr5	21.2 abc	214.8 e	13 abc	1 b	24.7 a	34.7 a	32 f	2.2 a	1.0 c	0.4 b
NC-Ve6	22.1 ab	268.2 c	15 ab	2 a	19.8 ab	28.9 bc	71 c	1.1 a	2.4 a	2.0 a
Co-Ve7	20.6 abc	275.6 b	18 a	1 b	20.4 ab	29.4 abc	81 b	1.2 a	2.2 a	1.8 a
CR-Ve8	18.4 ac	209.9 e	11 bc	1 b	19.2 ab	26.9 bc	82 b	2.3 a	1.1 bc	0.5 b

En la misma columna, valores con la misma letra, son significativamente iguales (DMRT  $\alpha$  0.05). Ts-Es= Tersal, Español; Rt-Va= Rojo de tlalquitenango, Valencia; Rh-Va= Rojo de Hualco, Valencia; Ccu-Vr= Criollo de cuauchichinola, Virginia; Ch-Vr= Criollo de Huitzuco; NC-Ve= NC17-UZCH; Co-Ve= Criollo de Ocozocuautila, Virginia; CR-Ve= CROC10, Virginia, AP= Altura de planta (cm), AF= Área foliar (cm<sup>2</sup>), NH= No. de hojas, CH= Color de las hojas, CSL= Color de semilla Luminosidad, CSC= Color de semilla Cromaticidad, PCS= Peso de 100 semillas, LS= Largo de semilla (cm), AS= Ancho de semilla (cm), RALS= Relación ancho/ largo de semilla.

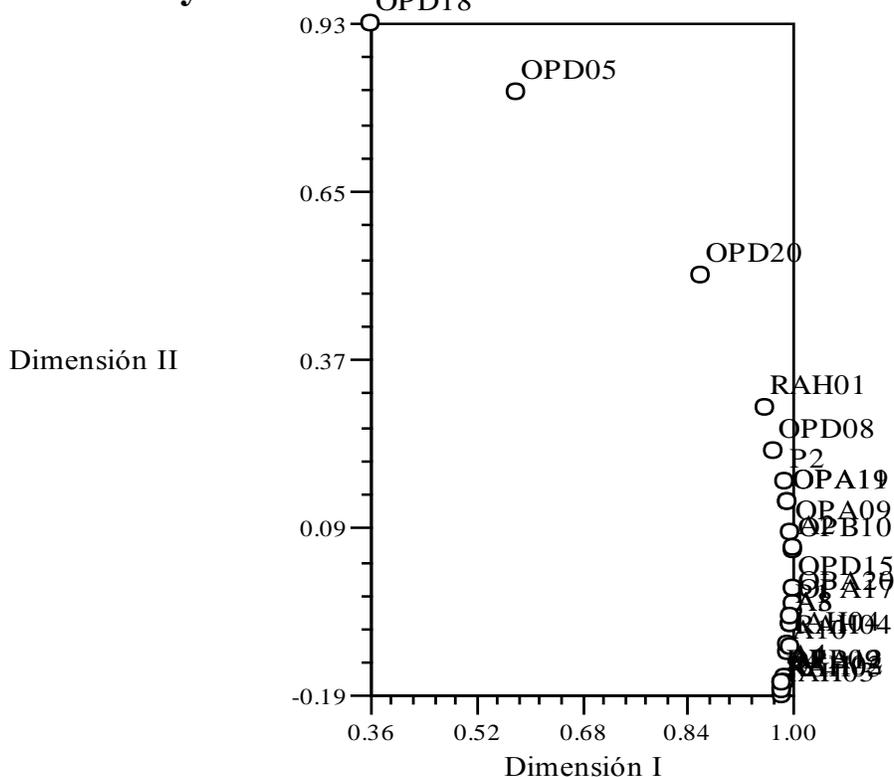
**Anexo 2.** Análisis de Componentes Principales para los Iniciadores RAPD e ISSR.

Componentes, eigenvalores y porcentajes individuales y acumulados del análisis de componentes principales de iniciadores.

Componente	Eigenvalor	Porcentaje (%)	
		Individual	Acumulado
1	27.58	91.93	91.93
2	2.36	7.88	99.81
3	0.05	0.18	100.00
4	0.00	0.00	100.00
5	0.00	0.00	100.00

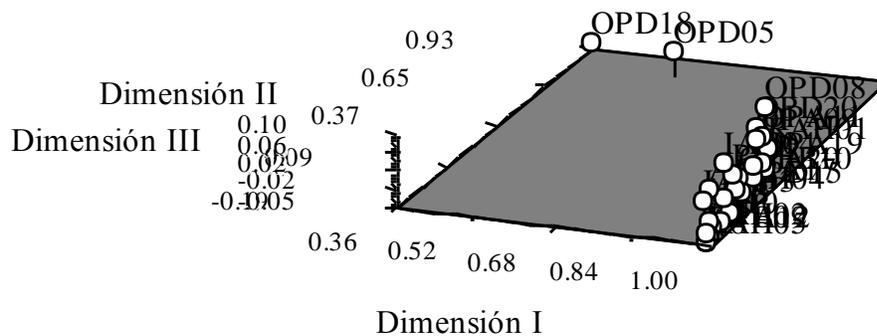
**Anexo 3.** Analisis de componentes principales proyección de los iniciadores en dos dimensiones.

**Proyección de los Iniciadores en Dos Dimensiones**



**Anexo 4.** Analisis de componentes principales proyección de los iniciadores en tres dimensiones.

### Proyección de los Iniciadores en Tres Dimensiones



**Anexo 5.** Analisis de componentes principales, contribución de las variables en los componentes principales 1, 2, 3 y 4.

Variable	Componente Principal (CP)			
	1	2	3	4
OPA09	0.9938	0.0828	0.0742	0.0000
OPA11	0.9892	0.1337	0.0594	0.0000
OPA12	0.9841	-0.1714	-0.0474	0.0000
OPA17	0.9986	-0.0521	0.0103	0.0000
OPA19	0.9911	0.1330	0.0103	0.0000
OPA20	0.9988	-0.0369	0.0314	0.0000
OPB09	0.9841	-0.1714	-0.0474	0.0000
OPB10	0.9986	0.0533	0.0037	0.0000
OPD05	0.5789	0.8154	-0.0030	0.0000
OPD08	0.9712	0.2184	<b>0.0957</b>	0.0000
OPD15	<b>0.9999</b>	-0.0122	-0.0030	0.0000
OPD18	<b>0.3573</b>	<b>0.9328</b>	-0.0474	0.0000
OPD20	0.8580	0.5112	-0.0501	0.0000
A1	0.9847	-0.1672	0.0482	0.0000
A2	0.9980	0.0567	0.0265	0.0000
A3	0.9969	-0.0732	-0.0292	0.0000
A4	0.9865	-0.1611	-0.0307	0.0000

A6	0.9818	-0.1817	<b>-0.0549</b>	0.0000
A7	0.9855	-0.1682	-0.0208	0.0000
A8	0.9969	-0.0732	-0.0292	0.0000
A10	0.9923	-0.1187	-0.0347	0.0000
IAH03	0.9807	<b>-0.1932</b>	0.0290	0.0000
IAH04	0.9914	-0.1043	0.0795	0.0000
RAH01	0.9575	0.2883	-0.0115	0.0000
RAH02	0.9835	-0.1767	-0.0381	0.0000
RAH04	0.9938	-0.1099	0.0139	0.0000
RAH05	0.9818	-0.1817	<b>-0.0549</b>	0.0000
P1	0.9972	-0.0605	0.0438	0.0000
P2	0.9858	0.1674	-0.0153	0.0000
P4	0.9841	-0.1714	-0.0474	0.0000

**Anexo 6.** Influencia de las variedades, tipo de explante e interacción entre ellos para la inducción de callos *in vitro* en *Arachis hypogaea* L.

.Fuente de variación	Variable
	Diametro de callo
Variedad	0.0914
Tipo de Explante	<0.0001
Variedad* Explante	0.0001

**Anexo 7.** Efecto de diferentes tipos de explantes, cultivares y concentraciones de 2,4-D en la variable diámetro de callos de *A. hypogaea* L. cultivados *in vitro*.

Fuente de variación	Variable
	Diametro de callo
<i>Explante</i>	
Cotiledón	0.75 c
Hoja	1.65 b
Yema	1.90 a
Tallo	0.60 c
<i>Variedad</i>	
Ts- Es	1.18 a
Rh-Va	1.27 a