



Universidad Autónoma
CHAPINGO

Universidad Autónoma Chapingo

Departamento de Fitotecnia

Maestría en Ciencias en Biotecnología Agrícola



DIVERSIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE AMARANTO CULTIVADAS Y SILVESTRES

T E S I S



QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER

EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS EN

BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
COMISIÓN DE EXÁMENES PROFESIONALES

P R E S E N T A

Victor Cuauhtémoc Ruiz Hernández

Chapingo, Méx., Abril, 2015



Instituto de Horticultura

DIVERSIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE AMARANTO CULTIVADAS Y SILVESTRES

Tesis realizada por el C. Victor Cuauhtémoc Ruiz Hernández bajo la dirección del Consejo particular que se indica, 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:



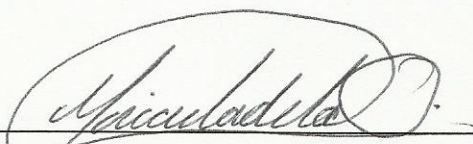
Dr. Juan Porfirio Legaria Solano

ASESOR:



Dr. Jaime Sahagún Castellano

ASESOR:



Dra. Micaela de la O Olán

Chapingo, Estado de México, marzo de 2015

DEDICATORIA

A mis padres y hermanos...

“Somos dueños de nuestro destino. Somos capitanes de nuestra alma”

Winston Churchill

AGRADECIMIENTOS

A **DIOS** por acompañarme y guiarme, ayudándome a no perder la esperanza y brindándome una vida llena de aprendizajes, experiencias y felicidad.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** (CONACyT) y a la **Universidad Autónoma Chapingo** (UACH) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de maestría y el presente trabajo de investigación.

A mi director **Dr. Juan Porfirio Legaria Solano** por su generosidad, presencia incondicional, capacidad y experiencia científica que permitió la realización del presente trabajo en un marco de confianza, afecto y amistad.

A mis asesores **Dr. Jaime Sahagún Castellanos** y a la **Dra. Micaela de la O Olan**, por brindarme su tiempo y consejos asertivos en la revisión de este trabajo.

A mis compañeros de Angi, Carmen, Chío, Dani y Jeff, por su compañía durante estos dos años.

DATOS BIOGRÁFICOS

El autor de la presente tesis nació el 12 de Febrero de 1981 en la Ciudad de Oaxaca de Juárez, Oaxaca. Realizó sus estudios de preparatoria y licenciatura en la Universidad Autónoma Chapingo, formando parte de la generación 2001- 2008. Obtuvo su título de Ingeniero Agrónomo Especialista en Fitotecnia en el año 2012 presentando su tesis titulada “Variabilidad cualitativa y cuantitativa mediante caracterización morfológica de accesiones de *Amaranthus spp.*” En enero de 2013 inicia sus estudios de Maestría en Biotecnología Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo en el Instituto de Horticultura del Departamento de Fitotecnia.

DIVERSIDAD GENÉTICA EN ESPECIES DE AMARANTO CULTIVADAS Y SILVESTRES

GENETIC DIVERSITY IN CULTIVATED AND WILD SPECIES OF AMARANTH

Victor Cuauhtémoc Ruiz Hernández¹; Juan Porfirio Legaria Solano².

RESUMEN

El Amaranto (*Amaranthus spp.*) posee una amplia variabilidad genética poco estudiada y con gran potencial de uso en programas de conservación y fitomejoramiento. En el presente estudio se realizó la caracterización de especies de amaranto cultivado y silvestre de México usando marcadores morfológicos y moleculares tipo ISSR. Los resultados indican que los marcadores moleculares discriminan mejor a las especies que los morfológicos. Se obtuvo un alto grado de similitud genética entre las especies cultivadas *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, asociados con las silvestres *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*, mientras que las especies más alejadas fueron *A. spinosus* y *A. palmeri*.

Palabras claves: relaciones filogenéticas, marcadores moleculares, polimorfismo.

ABSTRACT

Amaranth (*Amaranthus spp.*) has an extensive genetic variability that has not been studied in depth, and a great potential for using in conservation programs and plant breeding. In the present study, we characterized cultivated and wild amaranth species of Mexico using morphological and molecular markers ISSR type. The results indicated that the molecular markers discriminate better than the morphological ones. A much higher level of genetic similarity between *A. hypochondriacus* and *A. cruentus*, associated with *A. hybridus*, *A. powellii* and *A. retroflexus* was obtained, while the more distant related species were *A. spinosus* and *A. palmeri*.

Keywords: phylogenetic relationships, molecular markers, polymorphism.

¹ Autor de la tesis. ² Director de la tesis.

ÍNDICE

	Página
DEDICATORIA.....	iii
AGRADECIMIENTOS.....	iv
DATOS BIBLIOGRÁFICOS.....	v
ÍNDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS	xi
ÍNDICE DE FIGURAS	xii
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	1
OBJETIVO GENERAL.....	3
Objetivos particulares.....	3
REVISIÓN DE LITERATURA	4
Historia	4
Taxonomía.....	6
Botánica	8
Diversidad genética	10
Diversidad alfa.....	11
Diversidad beta.....	11
Diversidad gamma	11
Estructura genética.....	12
Frecuencias alélicas	12
Endogamia.....	13
Deriva génica.....	13
Flujo génico	14
Migrantes por generación (Nm).....	15
Uso de marcadores moleculares	16
Inter-Secuencias Simples Repetidas (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR).....	16
Caracterización.....	18
Antecedentes de la caracterización molecular y morfológica en amaranto	21
BIBLIOGRAFÍA.....	24

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES CULTIVADAS Y SILVESTRES DE AMARANTO (<i>Amaranthus spp.</i>)	34
RESUMEN	34
INTRODUCCIÓN	35
MATERIALES Y MÉTODOS	38
Material vegetal	38
Purificación de ADN	39
Reacción de PCR	41
Análisis estadístico de los datos	44
RESULTADOS	44
Caracterización molecular	46
Remuestreo	49
DISCUSIÓN	54
CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFÍA	56
 II. DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO Y ENTRE POBLACIONES DE AMARANTO (<i>Amaranthus spp.</i>) DE MÉXICO USANDO MARCADORES ISSR	60
RESUMEN	60
INTRODUCCIÓN	61
MATERIALES Y MÉTODOS	64
Material vegetal	64
Purificación de ADN	65
Reacción de PCR	67
Análisis de los datos	69
RESULTADOS	70
Diversidad genética y diferenciación de 13 poblaciones de amaranto	72
Diversidad genética y diferenciación de 7 especies de amaranto	80
Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)	84
DISCUSIÓN	86
CONCLUSIONES	89
BIBLIOGRAFÍA	90

III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACCESIONES DE AMARANTO	95
RESUMEN.....	95
INTRODUCCIÓN.....	96
MATERIALES Y MÉTODOS	97
Características evaluadas	100
Análisis de datos	102
RESULTADOS.....	104
Comparación de medias.....	111
Construcción del dendrograma y determinación de relaciones entre las accesiones de amaranto	118
Prueba de Mantel entre las matrices de datos morfológicos (UPOV vs IBPGR)	121
DISCUSIÓN.....	122
CONCLUSIONES.....	125
BIBLIOGRAFÍA.....	126
 IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA VS MOLECULAR DE ACCESIONES DE AMARANTO	 130
RESUMEN.....	130
INTRODUCCIÓN.....	131
MATERIALES Y MÉTODOS	132
Material vegetal.....	132
Caracterización morfológica	132
Caracterización molecular.....	136
Reacción de PCR.....	136
Análisis estadístico de los datos	138
RESULTADOS.....	139
Análisis de conglomerados y análisis de escalado multidimensional de marcadores morfológicos.....	139
Caracterización morfológica usando descriptores del IBPGR.....	139
Caracterización usando características cualitativas	139
Caracterización usando características cualitativas y cuantitativas	142
Caracterización morfológica usando descriptores de UPOV	145
Caracterización usando características cualitativas.....	145

Caracterización usando características cualitativas y cuantitativas	147
Caracterización molecular.....	150
Caracterización Morfológica vs Molecular	153
DISCUSIÓN.....	155
CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFÍA.....	160
 DISCUSIÓN GENERAL	 166
CONCLUSIÓN GENERAL.....	167
ANEXO 1.....	168
Descriptores de Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV)	 168
Descriptores de International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR).....	172

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Lista de accesiones de amaranto utilizadas, correspondientes a especies cultivadas y silvestres.....	38
Cuadro 2. Iniciadores ISSR utilizados durante la caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de amaranto.	42
Cuadro 3. Lista de iniciadores, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de polimorfismo detectados.	45
Cuadro 4. Coeficientes de similitud de Jaccard entre las accesiones de <i>Amaranthus</i> evaluadas... 50	50
Cuadro 5. Lista de accesiones utilizadas para el análisis de la diversidad genética en poblaciones de <i>Amaranthus</i>	64
Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados para el análisis de las poblaciones de amaranto.	67
Cuadro 7. Lista de iniciadores, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de polimorfismo detectados.	70
Cuadro 8. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genéticas (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para 13 poblaciones de amaranto.	74
Cuadro 9. Porcentaje y promedio de bandas generadas por iniciador por accesión.	76
Cuadro 10. Índices de diversidad genética dentro de 13 poblaciones del género <i>Amaranthus</i>	78
Cuadro 11. Análisis de diversidad genética de Nei entre 13 poblaciones del género <i>Amaranthus</i> . 80	80
Cuadro 12. Índices de diversidad genética dentro de siete especies del género <i>Amaranthus</i>	82
Cuadro 13. Análisis de diversidad genética de Nei entre especies del género <i>Amaranthus</i>	83
Cuadro 14. Medidas de Identidad genética y distancia genética de Nei para siete especies de amaranto.	84
Cuadro 15. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de accesiones de amaranto.	85
Cuadro 16. Lista de accesiones utilizadas en la caracterización morfológica.	98
Cuadro 17. Parámetros evaluados en la caracterización del germoplasma de amaranto.	101
Cuadro 18. Características cualitativas de las especies de amaranto.	105
Cuadro 19. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables cuantitativas evaluadas durante la caracterización morfológica de <i>Amaranthus</i> spp.	109
Cuadro 20. Promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y valor máximo y mínimo de la variables evaluadas durante la caracterización morfológica del género <i>Amaranthus</i> spp.	110
Cuadro 21. Análisis de varianza para las características cuantitativas evaluadas durante la caracterización morfológica de accesiones de amaranto.	111
Cuadro 22. Prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0.05$) entre las accesiones de <i>Amaranthus</i> para las características morfológicas cuantitativas estudiadas.	113
Cuadro 23. Eigen valores de los componentes principales para las variables evaluadas durante la caracterización morfológica de las accesiones de amaranto.	114

Cuadro 24. Contribución de las variables morfológicas a los primeros cuatro componentes principales.	115
Cuadro 25. Lista de accesiones de amaranto utilizadas, correspondientes a especies cultivadas y silvestres.....	133
Cuadro 26. Parámetros evaluados en la caracterización del germoplasma de amaranto.	134
Cuadro 27. Iniciadores ISSR utilizados durante la caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de amaranto.	137
Cuadro 28. Valores de correlación de Mantel obtenidos al comparar matrices generadas con diferentes tipos de marcadores.	153

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Plantas de amaranto sembradas en vasos de unicel, utilizadas para la purificación del ADN.	40
Figura 2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne®28TC-512.	43
Figura 3. Patrones de bandas obtenidas con el iniciador (AG) 8YA para las accesiones de <i>Amaranthus</i> . M, marcador de peso molecular.	46
Figura 4. Patrones de bandas obtenidas con el iniciador ISSR4 para las accesiones de <i>Amaranthus</i> . M, marcador de peso molecular.	47
Figura 5. Dendrograma de relaciones entre 25 accesiones de <i>Amaranthus</i> , obtenido con datos de ISSR.	48
Figura 6. Dendrograma de relaciones entre accesiones de <i>Amaranthus</i> obtenido con datos de ISSR, con 1000 re-muestreos.	52
Figura 7. Gráfica en 2D generada mediante escalado multidimensional y con datos de ISSR para 25 accesiones de amaranto.	53
Figura 8. Gráfica en 3D generada mediante escalado multidimensional y usando datos de ISSR para 25 accesiones de amaranto.	53
Figura 9. Plantas de amaranto sembradas en vasos de unicel, utilizadas para la purificación del ADN.	65
Figura 10. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne®28TC-512.	68
Figura 12. A. Patrones de bandas obtenidos con el iniciador P1 para una muestra de 5 individuos de las poblaciones de <i>A. hypochondriacus</i> , <i>A. cruentus</i> , <i>A. hybridus</i> y <i>A. retroflexus</i> . B. Patrones de bandeo obtenidos con el iniciador P1 para una muestra de 5 individuos de las poblaciones de <i>A. retroflexus</i> , <i>A. powellii</i> , <i>A. palmeri</i> y <i>A. spinosus</i> . M, marcador de peso molecular.	71
Figura 13. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones y especies de amaranto construido usando el coeficiente de identidad de Nei.	72

Figura 14. Dendrograma de relaciones genéticas entre 7 especies de amaranto construido con el coeficiente de identidad de Nei.	81
Figura 15. a) Emergencia de plántulas de amaranto; b) plantas de amaranto listas para trasplantar; c) disposición de las plantas de amaranto en el invernadero; d) desarrollo de las plantas adultas de amaranto.	99
Figura 16. Amarantos de grano. a) Inflorescencia de <i>A. hypochondriacus</i> ; b) hojas de <i>A. hypochondriacus</i> ; c) plantas de <i>A. hypochondriacus</i> ; d, e, f) plantas de <i>A. cruentus</i>	104
Figura 17. Características de las especies de amaranto silvestre. a, b, c, d) <i>A. hybridus</i> ; e, f, g, h) <i>A. retroflexus</i> ; i, j, k, l) <i>A. powellii</i> ; m, n, ñ, o) <i>A. palmeri</i> ; p, q, r) <i>A. spinosus</i>	107
Figura 18. Gráficas en 2 y 3 dimensiones resultantes del análisis de componentes principales de variables cuantitativas morfológicas de amaranto. X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas. A) Gráfico en 2D, B) gráfico en 3D.	116
Figura 19. Agrupación de las accesiones de amaranto según el análisis de componentes principales. A) Gráfico en 2D, B) gráfico en 3D.	117
Figura 20. Dendrograma obtenido usando datos de los descriptores morfológicos propuestos por IBPGR para la caracterización de las accesiones de amaranto.	119
Figura 21. Dendrograma obtenido usando descriptores morfológicos de UPOV para la caracterización de accesiones de amaranto.	120
Figura 22. Gráfico de la correlación entre las matrices generadas utilizando los descriptores propuestos por UPOV vs IBPGR, según la Prueba de Mantel.	122
Figura 23. Dendrograma de relaciones entre accesiones de <i>Amaranthus</i> , obtenido con los datos de variables cualitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR.	140
Figura 24. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.	¡Error! Marcador no definido.
Figura 25. Dendrograma de relaciones entre accesiones de <i>Amaranthus</i> , obtenido con los datos de variables cualitativas y cuantitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR.	143
Figura 26. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas más cuantitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.	144
Figura 27. Dendrograma de relaciones entre accesiones de <i>Amaranthus</i> , obtenido con los datos de variables cualitativas correspondientes a los descriptores propuestos por UPOV.	145
Figura 28. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas correspondientes a los descriptores de UPOV. A) Gráfico en 2D; B) gráfico en 3D.	147
Figura 29. Dendrograma de relaciones entre accesiones de <i>Amaranthus</i> , obtenido con los datos de variables cualitativas más cuantitativas correspondientes a los descriptores propuestos por UPOV.	148
Figura 30. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas y cuantitativas correspondientes a los descriptores de UPOV. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.	149
Figura 31. Dendrograma de relaciones genéticas entre accesiones de <i>Amaranthus</i> obtenido usando marcadores moleculares tipo ISSR.	151

Figura 32. Escalado multidimensional obtenido a partir de datos de marcadores moleculares tipo ISSR. Gráfico en 2D.	152
Figura 33. Escalado multidimensional obtenido a partir de datos de marcadores moleculares tipo ISSR. Gráfico en 3D.	152
Figura 34. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: a) IBPGR cualitativos vs IBPGR cualitativos más cuantitativos; b) UPOV cualitativos vs UPOV cualitativos más cuantitativos.	155

INTRODUCCIÓN GENERAL

El género *Amaranthus* (Magnoliophyta: Caryophyllidae) comprende 70 especies agrupadas en tres subgéneros. El subgénero económicamente más importante es *Amaranthus*, que incluye las tres especies domesticadas para la producción de granos: *Amaranthus hypochondriacus*, *Amaranthus cruentus* y *Amaranthus caudatus*. Otras especies de amaranto se han domesticado por su uso de la hoja como verdura, para forraje, como hierbas aromáticas, o como plantas ornamentales; entre estas especies está *A. tricolor*, originaria del sur de Asia, que es probablemente la más importante (Sauer, 1967).

La gran adaptabilidad presente dentro de las especies de amaranto da una idea acerca de la diversidad genética inherente a la familia Amarantácea, donde este rasgo ha sido la base para la supervivencia a largo plazo de las especies y la adaptación que hace que sea posible continuar y avanzar en los procesos evolutivos (Hamrick y Godt, 1996; Rao, 2004).

Los recursos fitogenéticos son producto de la suma de todas las combinaciones de genes resultantes de la evolución de una especie. Comprenden desde especies silvestres con potencial agrícola hasta genes clonados (Hidalgo, 2003). Los recursos fitogenéticos se conservan para utilizarlos, y ello sólo es posible si se conocen sus características y usos posibles. La información que permite conocer el germoplasma y determinar su utilidad proviene de tomar y analizar un conjunto de datos sobre el germoplasma, en diversas etapas de la conservación pero principalmente durante la caracterización y la evaluación (Jaramillo y Baena, 2000).

La diversidad genética puede analizarse a través de aproximaciones cuantitativas (Solbrig, 1991). Los polimorfismos en características morfológicas cuantitativas generalmente no proporcionan estimados tan precisos de la variación genética como los datos moleculares, pero el valor adaptativo de tal variación es más aparente que los datos moleculares. Los diferentes tipos morfológicos (fenotipos) constituyen la diversidad morfológica o fenética dentro de una especie. Muchas características morfológicas pueden influir directamente en la variación de historias de vida de los organismos y pueden, en algunos casos, relacionarse directamente con su adaptación. La variación morfológica observada puede separarse en sus componentes ambiental y genético. La variación genética se estima mediante el estudio de correlaciones entre las características morfológicas de parientes cercanos (Solbrig, 1991; Hunter y Sulzer, 1996; Mallet, 1996).

En ocasiones, los datos de caracterización morfo-agronómicas no son suficientes para establecer diferencias entre especies o entre accesiones. Es posible estudiar directamente el genoma utilizando marcadores bioquímicos (isoenzimas) y moleculares (microsatélites, polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (RAPD) y otros disponibles. Estas metodologías permiten localizar los genes de interés con mayor exactitud pero no evalúan el efecto del ambiente en la expresión de esos genes. En consecuencia, no sustituyen, sino que complementan la caracterización morfo-agronómica (Jaramillo y Baena, 2000).

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la diversidad genética de accesiones de *Amaranthus*, por medio de caracterización morfológica utilizando los descriptores propuestos por la UPOV e IBPGR (1981), además de estimar la diversidad genética intra e inter especies mediante el uso de marcadores moleculares tipo ISSR.

Objetivos particulares

Establecer relaciones genéticas entre siete especies de *Amaranthus*.

Analizar la estructura genética entre y dentro de las poblaciones.

Comparar la eficiencia de los marcadores morfológicos y los moleculares para caracterizar y discriminar genotipos de amaranto mediante pruebas de correlación de Mantel.

REVISIÓN DE LITERATURA

Historia

El amaranto desde el inicio de su historia ha estado ligado a la alimentación del hombre, ya que cuando este último se hizo sedentario recolectaba las hojas y tallos jóvenes que le servían de alimento (Sauer, 1950). La palabra amaranto deriva del griego *marainein* (marchitar) y del prefijo *a* (ausencia de), es decir, su significado es “no se marchitan”. Efectivamente, las flores de las especies de *Amaranthus* permanecen mucho tiempo en buen estado, por lo que el *A. caudatus* L. fue utilizado, desde los tiempos más remotos, para adornar los sepulcros de los dioses y los monumentos de estos (Ornelas, 1981).

El género *Amaranthus* se distribuye ampliamente en América, presentando gran variabilidad genética, que se aprecia en la diversidad de características de la planta como el tipo de inflorescencia, color de semilla, precocidad, contenido proteínico de la semilla y resistencia a plagas y enfermedades. Es un cultivo fácil de establecer pues prospera en regiones temporaleras donde los cultivos básicos tienen poco éxito, se adapta a varios tipos de suelo, altitudes, temperaturas y fotoperiodos, así como a diversos requerimientos de pH y precipitación (Mapes, 2001; Jacobsen y Sherwood, 2002).

El amaranto de grano (*Amaranthus* spp.) es nativo del Nuevo Mundo. Algunas poblaciones indígenas han utilizado el grano de amaranto, junto con el maíz y el frijol, como parte integrante de sus sistemas de cultivo (Espitia *et al.*, 2010). El amaranto cultivado, también conocido como “alegría”, fue uno de los cultivos básicos de los aztecas. Se utilizaba como alimento y al mismo tiempo jugaba un

papel ceremonial y religioso. El cultivo fue casi suprimido por la iglesia católica durante la conquista española en su esfuerzo por erradicar las ceremonias paganas que se celebraban alrededor del amaranto. A mediados del siglo pasado, el cultivo de grano de amaranto se había reducido hasta el punto que se cultivaba sólo en pequeñas parcelas en México, el altiplano andino y en el Himalaya de la India y Nepal. Incluso actualmente existen evidencias de que algunos agricultores tradicionales están abandonando el cultivo de variedades locales de amaranto, ya que dedican más sus tierras a cultivos de rendimientos más altos (Kauffman y Weber, 1990). En la actualidad, su cultivo en México se ha reducido a pequeñas zonas, de las que las principales se ubican en el Distrito Federal y en los estados de Tlaxcala, Morelos y Puebla, constituyendo el área más importante del cultivo (Espitia *et al.*, 2010). En los últimos cinco años el amaranto se siembra en grandes extensiones en muchas partes del mundo como Estados Unidos, Canadá, Europa y Nueva Zelanda (Williams y Brenner, 1995).

La especie más común en México es *A. hypochondriacus* L., aunque también se encuentra a *A. cruentus* L. y tres especies no cultivadas como *A. retroflexus* L., *A. scariosus* Benth y *A. hybridus* L. Posiblemente existan más especies silvestres pero no hay certeza de ello. *A. hypochondriacus* es la especie más difundida en el país y la de mayor importancia actualmente y se le encuentra a veces mezclada con *A. cruentus* L. En algunas regiones la altitud a la cual se cultiva está en torno a los 1,000 msnm, pero en otros países se da a altitudes mayores (Sánchez, 1980).

El interés por el amaranto a nivel mundial, como fuente de grano y verdura, ha ido gradualmente en aumento ya que además de su alto contenido nutricional, posee numerosas características agronómicas deseables, como una alta tolerancia a suelos pobres y/o salinos, climas semiáridos y/o condiciones desfavorables del medio ambiente, así como la producción de grandes volúmenes de biomasa. Además, el amaranto de grano es considerado una alternativa excelente para regiones con dificultades para la siembra de cereales (Omamt *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2009).

Taxonomía

Hunziker (1991) estima que en el mundo existe poco menos de 90 especies del género *Amaranthus*, sumando a 17 del viejo mundo, unas 14 australianas y 56 de América. Estas últimas incluyen 10 especies dioicas. Sólo E. U. A. y México suman un total de 29 especies.

El género *Amaranthus* está dividido en dos secciones: Sección *Amaranthus* y Sección *Blitopsis*. Los caracteres usados con más frecuencia para la clasificación de las especies dentro de las secciones son la forma y proporción de las partes florales pístiladas (Feine *et al.*, 1979).

Kauffman y Reider (1984) proponen la clasificación que se utiliza en la actualidad, donde los tipos 'Azteca', 'Nepal', 'Mercado', 'Mixteco' y 'Picos' pertenecen a *A. hypochondriacus*; los tipos 'Mexicano', 'Africano' y 'Guatemalteco' pertenecen a *A. cruentus*; el tipo 'Prima' pertenece a *A. hybridus*; mientras que el 'Sudamericano' y

‘Edulis’ entran en *A. caudatus*. Los tipos ‘Azteca’ y ‘Mixteco’ fueron sugeridos para clasificar los amarantos de la especie *A. hypochondriacus* con origen en el D.F., Estado de México, Tlaxcala y Puebla (tipo ‘Azteca’) y los del Estado de Oaxaca (tipo ‘Mixteco’), de acuerdo con las civilizaciones que florecieron en estos lugares en la época precolombina.

Reino: Vegetal

División: Fanerógama

Tipo: Embryophyta siphonogama

Subtipo: Angiosperma

Clase: Dicotyledonae

Subclase: Archyclamidae

Orden: Centrospermales

Familia: Amaranthaceae

Género: *Amaranthus*

Sección: *Amaranthus*

Especies: *caudatus*, *cruentus* e *hypochondriacus*.

La hibridación interespecífica que ocurre naturalmente dentro del género es uno de los factores principales que ha causado la variación dentro de especies y la complejidad taxonómica de *Amaranthus* (Alejandre y Gómez, 1999).

Botánica

El amaranto comprende hierbas anuales, monoicas, dioicas o polígamas, es una planta herbácea o arbustiva de diversos colores que van del verde al morado o púrpura con distintas coloraciones intermedias (Mujica *et al.*, 1997; Sánchez, 1999).

La raíz es pivotante con abundante ramificación y múltiples raicillas delgadas, que se extienden rápidamente después que el tallo comienza a ramificarse, facilitando la absorción de agua y nutrientes, la raíz principal sirve de sostén a la planta, permitiendo mantener el peso de la panoja (Mujica *et al.*, 1997).

Con tallos postrados, erectos, ascendentes o infrecuentemente decumbentes, simples a muy ramificados, glabros a vilosos, tricomas pluricelulares, blanquecinos o amarillentos, simples o espiralados (Sánchez, 1999), cilíndrico y anguloso con gruesas estrías longitudinales que le dan una apariencia acanalada, alcanzan de 0.4 a 3 m de longitud, cuyo grosor disminuye de la base al ápice, presenta distintas coloraciones que generalmente coinciden con el color de las hojas, aunque a veces se observan estrías de diferentes colores, presenta ramificaciones que en muchos casos comienzan desde la base o media altura y que se originan de las axilas de las hojas (Mujica *et al.*, 1997).

Las hojas son pecioladas, sin estipulas, de forma oval, elípticas, opuestas o alternas con nervaduras prominentes en el envés, lisas o poco pubescentes de color verde o púrpura cuyo tamaño disminuye de la base al ápice, presentando borde entero de tamaño variable de 6.5 a 15 cm (Mujica *et al.*, 1997). Rara vez un par de espinas presentes en la base de las hojas, coriáceas a membranáceas, a

veces suculentas, margen entero a ligeramente sinuado, base redondeada a deltoide y/o atenuada, a veces asimétricas, sésiles a pecioladas (Sánchez, 1999). Las inflorescencias de tipo espigas, racimos o panículas de espigas (flores congestionadas hacia el ápice) axilares y/o terminales; raquis primero viloso, viloso-glandular a glabro, generalmente sésil o pedunculado, raquis secundarios vilosos, viloso-glandulares a glabro, sésiles, raquis terciarios rara vez presentes; brácteas de la inflorescencia ausentes o presentes (Sánchez, 1999), pueden variar de totalmente erectas hasta decumbentes, con colores que van desde amarillo, naranja, café, rojo, rosado, hasta el purpura, el tamaño varía de 0.5 a 0.9 m (Mujica *et al.*, 1997).

Flores imperfectas en su mayoría, sésiles, estaminadas y pistiladas, estando las estaminadas en el ápice del glomérulo y las pistiladas completan el glomérulo, el androceo está formado por cinco estambres de color morado que sostiene a las anteras por un punto cercano a la base, el gineceo presenta ovario esférico, súpero coronado por tres estigmas filiformes y pilosas, que aloja a una sola semilla (Tapia, 1997; Sánchez, 1999).

Fruto con utrículo (indehiscente), pixidio (circuncísil) o irregularmente dehiscente, liso, rugoso con picos apicales endurecidos (Sánchez, 1999). Las semillas de amaranto son pequeñas, ovaladas, blancas, lisas, brillantes u opacas y ligeramente aplanadas. Su peso varía entre 0.06 a 0.09 gramos por 100 semillas (Feine *et al.*, 1979). Con colores que van desde el negro al blanco, aunque existen colores amarillentos, cafés, dorados, rojos, rosados y púrpuras; y en las especies silvestres de color negro con el episperma muy duro (Stallknecht y Schulz, 1993).

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 entre los individuos de una población y entre las poblaciones dentro de una especie. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones (Piñero, 2008).

Para De Vicente *et al.* (2004) la variabilidad genética se refiere a la variación de los genes dentro de la especie. Esto abarca poblaciones diferenciadas de la misma especie o la variación genética dentro de una población. Las mutaciones de genes y cromosomas generan nueva variación genética, la cual se propaga por recombinación durante la reproducción sexual.

La biodiversidad o diversidad biológica la define Moreno (2001) como “la variabilidad entre los organismos vivos de todas las fuentes, incluyendo, entre otros, los organismos terrestres, marinos y de otros ecosistemas acuáticos, así como los complejos ecológicos de los que forman parte; esto incluye diversidad dentro de las especies, entre especies y de ecosistemas”. La diversidad genética hace posible que las poblaciones se adapten a condiciones cambiantes del medio ambiente.

La variación genética puede detectarse a escala molecular estudiando directamente los cambios en la estructura del ADN, o indirectamente en las proteínas que codifican genes específicos. Otra aproximación se basa en la variación morfológica de caracteres cuantitativos y en la separación de esta variación en sus componentes genético y ambiental (Solbrig, 1991). La descripción

de la diversidad se puede hacer dentro de una población o entre poblaciones. También puede extenderse a unidades más grandes como zonas y regiones (De Vicente *et al.*, 2004).

Diversidad alfa

Se refiere a la diversidad presente dentro de las comunidades o como el número de especies a nivel local, y la gran mayoría de los métodos propuestos para evaluar la diversidad de especies se basan en esto (Moreno, 2001; Rodríguez y Vásquez, 2003).

Diversidad beta

Para Rodríguez y Vásquez (2003) la diversidad beta es, en su definición más general, la diferencia en composición de especies entre comunidades, mientras que Moreno (2001) menciona que es el grado de reemplazamiento de especies o cambio biótico a través de gradientes ambientales. La medición de la diversidad beta es de una dimensión diferente porque está basada en proporciones o diferencias, estas proporciones pueden evaluarse con base en índices o coeficientes de similitud, de disimilitud o de distancia entre las muestras a partir de datos cualitativos o cuantitativos.

Diversidad gamma

Whittaker (1972) citado por Moreno (2001) define la diversidad gamma como la riqueza en especies de un grupo de hábitats (un paisaje, un área geográfica, una

isla) que resulta como consecuencia de la diversidad alfa de las comunidades individuales y del grado de diferenciación entre ellas (diversidad beta).

Estructura genética

Cuando hablamos de una especie con alta estructura genética, nos referimos a que se pueden detectar fuertes diferencias en las frecuencias alélicas entre las poblaciones. En contraste, en una especie con baja estructura genética, las poblaciones que la constituyen son casi idénticas, con nulas o muy pocas diferencias en las frecuencias alélicas (Eguiarte *et al.*, 2010). Las distintas medidas de estructura genética están relacionadas entre sí, y se basan en analizar las diferencias en las frecuencias alélicas. Las pruebas más sencillas simplemente comparan estadísticamente estas últimas. Otros métodos se basan en estimar la proporción de variación genética que se encuentra dentro y entre las poblaciones, usualmente empleando el estadístico F_{st} o sus análogos, que permiten comparar de manera clara y cuantitativa la diferenciación existente entre poblaciones de distintas especies (Piñero, 2008a).

Frecuencias alélicas

El primer paso para analizar la estructura y diferenciación genética de poblaciones es la obtención de las frecuencias alélicas. En genes codominantes (en los que se pueden diferenciar los heterocigotos de los homocigotos), como isoenzimas, microsatélites, o secuencias de genes nucleares de copia única, es relativamente

sencilla la estimación de las frecuencias alélicas y se desprende de los principios básicos de la genética de poblaciones (Eguiarte *et al.*, 2010).

Endogamia

La endogamia se refiere al apareamiento no aleatorio en donde la probabilidad de que un individuo sea homocigoto (con alelos idénticos por descendencia) es mayor que para una población panmíctica. Por lo tanto, la endogamia representa una violación al supuesto de la panmixia, y reduce el número real de individuos reproductivos (Moreno, 2007).

Wright (1965) desarrolló lo que se conoce como el coeficiente de endogamia (F_{is}), definido como: $F_{is} = (H_s - H_o) / H_s$, donde H_s es la heterocigosis promedio por subpoblación y la H_o es la heterocigosis observada entre el valor fenotípico de la F_1 y el valor del progenitor medio o el del progenitor superior. Si se calcula para una sola población, la F_{is} corresponde al índice de fijación o de endogamia (Eguiarte *et al.*, 2010). Este coeficiente puede tomar un valor de -1 a 1. Si es de 0 no hay endogamia y la población está en equilibrio de Hardy Weinberg. Cuando el valor es negativo, significa que hay un exceso de heterocigotos y si es positivo que hay un exceso de homocigotos, ya que cuando $H_o < H_e$ se asume que en esa población se produjeron más apareamientos endogámicos de lo que se espera por azar (Abarca y López, 2007).

Deriva génica

En el proceso de deriva génica, los alelos presentes en un momento dado en una población de individuos diploides son sólo una muestra de los alelos presentes en

la generación previa, ya que algunos de ellos no fueron transmitidos a la siguiente generación únicamente por azar, y así sucesivamente hacia el pasado. Con el paso del tiempo con los individuos aislados de otras poblaciones, las siguientes generaciones presentarían cada vez menos copias de los alelos originales y cada vez los individuos se volverían más homocigotos, aumentando también la probabilidad de que sus alelos sean idénticos por descendencia (De Vicente *et al.*, 2004; Moreno, 2007).

Flujo génico

El flujo génico se refiere a todos los mecanismos que generan movimiento de genes de una población a otra (Aguirre, 2007). Uno de los problemas en el análisis de la estructura de las poblaciones es determinar la cantidad de flujo génico. El flujo génico es un componente principal de la estructura poblacional porque determina hasta qué punto cada población local de una especie es una unidad evolutiva independiente. Si existe una gran cantidad de flujo génico entre poblaciones locales, entonces todas las poblaciones evolucionan juntas; pero si hay poco flujo génico cada población evoluciona en forma casi independiente (Slatkin, 1994).

La estimación del flujo génico se basa principalmente en observar la distribución espacial de alelos en las poblaciones para hacer inferencias de los niveles o patrones de flujo génico en las poblaciones (Slatkin, 1985). Los modelos teóricos de flujo génico surgen de los conceptos desarrollados por Sewall Wright y suponen que los organismos están formando poblaciones discretas (modelo de

islas) que se diferencian por mutación y deriva génica o bien que forman poblaciones con una distribución continua (modelos de aislamiento por distancia) en donde la probabilidad de flujo génico disminuye al incrementarse la distancia espacial (Slatkin, 1994; Aguirre, 2007; Piñero, 2008a).

El método indirecto más comúnmente utilizado para la estimación del flujo génico se basa en el cálculo del estadístico F_{st} de Wright, el cual es una medida de la correlación entre los genes en una subpoblación en relación a la población entera. Para dos alelos en un locus, F_{st} es aproximadamente $V_p / p(1-p)$, donde V_p es la varianza en la frecuencia alélica entre las subpoblaciones y p es la frecuencia promedio (Slatkin, 1994).

Migrantes por generación (Nm)

Si Nm es mucho mayor que 1, el flujo génico sobrepasa los efectos de la deriva e impide la diferenciación local. Si Nm es mucho menor que 1, la deriva actúa en forma casi independiente en cada población (Slatkin, 1994).

Piñero (2008a), menciona que Nm es el resultado de la multiplicación del tamaño efectivo de la población (N_e) por la tasa de migración (m). Mientras que Slatkin (1994) menciona que se puede obtener una estimación indirecta de Nm calculando F_{st} a partir de los datos de las frecuencias alélicas y luego calculando Nm a partir de la fórmula $1/(4F_{st} - 1)$. Para que un estimador del promedio de Nm sea útil, debería poseer tres propiedades deseables. Primero, debería ser relativamente insensible a otras fuerzas que no sean el flujo génico o la deriva genética. En particular, debería ser insensible a la tasa de mutación y a la

intensidad de la selección, si las hay, que afecten a un locus. Segundo, no debería ser sensible al patrón actual de flujo génico de una población y tercero, debería aproximarse relativamente rápido a su valor de equilibrio para asegurar que las estimaciones reflejen lo más posible el flujo génico actuante.

Uso de marcadores moleculares

La variación genética oculta es mucho más extensa que la que se observa a través del fenotipo; tanto es así, que es prácticamente imposible que dos individuos en una población tengan el mismo genotipo en todo los *loci*. Esta variación genética puede detectarse mediante tecnologías moleculares que evidencian polimorfismos, los cuales resultan útiles como marcadores genéticos (De Vicente *et al.*, 2004). Los enfoques que se han usado para evaluar la variación genética en especies mexicanas incluyen isoenzimas, polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP), repeticiones de secuencias internas (ISSR, por sus siglas en inglés), microsatélites y secuencias de ADN (Solbrig, 1991; Hunter y Sulzer, 1996; Mallet, 1996; Piñero, 2008a).

Inter-Secuencias Simples Repetidas (Inter Simple Sequence Repeats, ISSR)

Los ISSRs son un tipo de marcador genético dominante que permiten obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en

varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tándem de motivos simples como $(CT)_n$ o $(CA)_n$ (Gonzales y Aguirre, 2007). En la técnica de ISSRs se utilizan 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 microsatélite blanco, y el nucleótido extra permite la amplificación solamente si el iniciador se pega a la terminación 5' del microsatélite con un primer nucleótido disponible en la secuencia flanqueadora (Bornet y Branchard, 2001). Los ISSRs han sido utilizados en especies de plantas cultivadas desde 1994, pero sólo recientemente se han empleado en estudios de la variación poblacional en especies silvestres (Rentería, 2007).

Los ISSRs son marcadores semi-arbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o 'primer' complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto) (González y Aguirre, 2007).

Las ventajas principales de los ISSRs consisten en que generan un gran número de bandas polimórficas, no requieren altas concentraciones de ADN, para diseñar los 'primers' no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio, y pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Finalmente, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (De Vicente y Fulton, 2004; Rentería, 2007; González y Aguirre, 2007).

Por otro lado, las limitaciones de los ISSRs son: las bandas son leídas como marcadores dominantes, es decir cuando se tiene la presencia de una banda no se sabe si el individuo es homocigoto dominante o heterocigoto; y la evaluación de la diversidad genética se basa en considerar que cada banda representa un locus con dos alelos y que el alelo dominante está en equilibrio Hardy-Weinberg (De Vicente y Fulton, 2004; Rentería, 2007; Gonzales y Aguirre, 2007).

Caracterización

La caracterización consiste en describir los atributos cualitativos y cuantitativos de las accesiones de una misma especie para diferenciarlas, determinar su utilidad, estructura, variabilidad genética y relaciones entre ellas, así como localizar genes que estimulen su uso en la producción o en el mejoramiento de cultivos (Jaramillo y Baena, 2000). En la caracterización de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de individuos que la integran. Como sucede con todos los organismos vivos que se desarrollan en condiciones naturales, la población de individuos que conforman una especie vegetal está bajo una continua interacción dinámica de adaptación con los factores en los que crece. Dichos factores son los bióticos (microorganismos, otras especies vegetales, animales inferiores y superiores) y los abióticos (clima y suelo), para ello, cada especie adapta la información contenida en el genoma de acuerdo con las necesidades de sobrevivir en su entorno. El resultado de esta interacción adaptativa se traduce en la acumulación de la información genética que a manera de variantes cada especie va guardando entre los miembros de su población, y

que se va transmitiendo en las subsiguientes generaciones a través del tiempo (Hidalgo, 2003).

Todos los genes cumplen funciones determinadas y sus efectos pueden o no expresarse en características identificables de forma visual. Esto quiere decir que hay una variabilidad que se puede detectar a simple vista y otra que, aunque no es visible fácilmente, también existe en la especie pero que requiere de técnicas especiales para ser detectada. El primer nivel se refiere a la caracterización de la variabilidad detectable visualmente, la cual se puede dividir en los tipos siguientes:

- Las características responsables de la morfología y la arquitectura de la planta utilizadas en un principio para la clasificación botánica y taxonómica, aunque en muchas de ellas se pueden encontrar variantes.
- Una serie de características relacionadas especialmente con aspectos de manejo agronómico y de producción de la especie que son de interés para mejoradores y agrónomos. En la mayoría de los bancos de germoplasma de programas existentes actualmente se hace una caracterización morfo-agronómica en la que se fusionan estos dos primeros tipos.
- Un grupo de características detectables visualmente que sólo se expresan como reacción a estímulos del medio ambiente. Estos pueden ser bióticos como plagas y enfermedades; o abióticos como sequías, deficiencias de minerales y cambios en temperatura, entre otros.

El segundo nivel se refiere a la caracterización de la variabilidad que no es detectable por simple observación visual. Esta caracterización se denomina

molecular porque se refiere a la identificación de productos y/o funciones internas de la célula (Hidalgo, 2003).

Espitia (1987) señala que dentro del proceso de la investigación sobre mejoramiento de un cultivo la caracterización juega un papel fundamental, la cual es realizada generalmente por los conservadores de recursos genéticos.

Para Grubben y Sloten (1981) la caracterización es el registro de los caracteres altamente heredables de una planta, que pueden ser distinguidos a simple vista y que se expresan en todos los ambientes. Comúnmente junto con la caracterización se efectúa una evaluación preliminar, la cual consiste en el registro de un conjunto de características adicionales deseables en un cultivo en particular. Cárdenas (1983) considera que la caracterización es lo mismo que evaluación preliminar e indica que tiene como objetivo fundamental estudiar materiales tomando como base aquellas características cuya variación fenotípica es menos afectada por las condiciones ambientales.

Dentro del proceso de la investigación sobre mejoramiento de un cultivo la caracterización juega un papel fundamental, la cual es realizada principalmente por los conservadores de recursos genéticos. La caracterización es el conjunto de observaciones que permiten distinguir a una población de plantas que constituyen una variedad vegetal (Ornelas, 1981).

Antecedentes de la caracterización molecular y morfológica en amaranto

Los géneros de la familia de amaranto tienden a mostrar variación fenotípica causada en parte por el ambiente. La variación fenotípica es el resultado de la interacción entre los factores genéticos y ambientales. Uno de los marcadores moleculares que es ampliamente utilizado para la detección de la variación genética es RAPD. RAPD se utiliza para la detección de polimorfismos en un gran número de *loci* y para atribuir relaciones taxonómicas y genéticas inequívocas entre diferentes taxones (Fatinah *et al.*, 2012).

Los estudios sobre el número de cromosomas y la fertilidad de los híbridos (Gupta y Gudu, 1991), la evaluación de variabilidad genética mediante el uso del ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD) (Transue *et al.*, 1994), la detección de la variación mediante restricción del ADN de cloroplasto y el ADN nuclear (Lanoue *et al.*, 1996) han aclarado algunos aspectos sobre la diversidad genética y las relaciones evolutivas entre el amaranto de grano y sus parientes silvestres. Estos estudios han permitido el desarrollo de algunas hipótesis sobre el origen geográfico de las especies y establecer vínculos filogenéticos entre ellas. Además, ha habido una serie de pruebas en la caracterización molecular de germoplasma con el fin de obtener resultados útiles para los mejoradores. A pesar de los avances que se tienen, no hay un método único de caracterización para asegurar la diferenciación entre las especies o para permitir la obtención de un marcador molecular particular (Rao, 2004). En los últimos años, se ha prestado especial atención a examinar las variaciones de las secuencias amplificadas obtenidas con iniciadores para marcadores AFLP o secuencias ISSR.

Popa *et al.* (2010) reportan un porcentaje de polimorfismo relativamente bajo en especies de amaranto luego de hacer un análisis con marcadores RAPD para aclarar las relaciones filogenéticas entre las mismas. Es posible que los cebadores utilizados en este estudio anclaran y amplificaran principalmente en la parte conservada del genoma de los individuos evaluados, de modo que no pudieron detectar variaciones dentro de una población. El análisis de agrupamiento mostró diferencias entre las especies silvestres de amaranto y una relación cercana entre las cultivadas *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, siendo la distancia genética entre ellos de 18-20 %.

Por otra parte, Mandal y Das (2002) realizaron un estudio de diversidad genética para los amarantos de grano *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. cruentus*, por medio de RAPD. Detectaron que el grado de polimorfismo fue más alto en *A. cruentus* (69.2 %) seguido por *caudatus* (38.5 %) y el más bajo (15.4 %) lo tuvo *A. hypochondriacus*. El patrón de agrupamiento del dendrograma reveló que *A. cruentus* es la especie más alejada mientras que *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* son las más cercanas.

Los estudios de diversidad genética han demostrado un nivel mayor de similitud genética entre *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, y la separación de *A. cruentus* (Transue *et al.*, 1994; Chan y Sun, 1997; Mandal y Das, 2002; Legaria, 2010).

Legaria (2010) indica que las razas ‘Mercado’ y ‘Azteca’ de *A. hypochondriacus* se encuentran genéticamente más cercanas entre sí y alejadas de la raza ‘Nepal’, que agrupó a mayor distancia. La diversidad genética detectable en *Amaranthus* se encuentra dentro de especies y razas, más que entre especies y razas. El

porcentaje de *loci* polimórficos entre poblaciones fue de 73.05 %, y dentro de las poblaciones se encontró baja variabilidad genética para la mayoría de ellas, con porcentajes de *loci* polimórficos que variaron de 27.66 % para *A. caudatus* raza 'Sudamericana' hasta 65.96 % en *A. hypochondriacus* raza 'Azteca'.

Joshi *et al.* (2011) hacen un estudio de caracterización y evaluación en amaranto en el cual utilizan los descriptores del IBPGR (13 características cualitativas y 8 rasgos cuantitativos), los cuales incluyen el hábito de crecimiento, índice de ramificación, pubescencia y pigmentación del tallo, presencia de espinas en las axilas de las hojas, pubescencia, pigmentación, forma de la hoja, la prominencia de venas de la hoja, la pigmentación del pecíolo, forma de la inflorescencia terminal, y el color de la inflorescencia, mientras que los rasgos cuantitativos registrados fueron altura de la planta, número de ramas, longitud de la hoja, ancho de hoja, longitud del pecíolo, peso de las hojas, peso del tallo y peso de las semillas. El germoplasma mostró una amplia gama de variabilidad en la altura de la planta (46.0- 149.5 cm), número de ramas (5.5 a 20.5), longitud de la hoja (10.0 a 24.5 cm), ancho de hoja (5.2 a 12.7 cm), longitud del pecíolo (05.07 a 12.07 cm), peso de hojas por planta (7.0-119.0 g), peso de tallo por planta (28.0 a 975.0 g) y el rendimiento de semillas por planta (6.0 a 58.0 g), lo que indica la posibilidad de explotar esta variación para llevar a cabo mejora varietal en amaranto. Del mismo modo, Wu *et al.* (2000) citados por Joshi (2011), informaron de la presencia de amplia diversidad en caracteres agronómicos entre genotipos de amaranto y también identificaron varios genotipos potenciales para el desarrollo de nuevos cultivares.

También, Oboh (2007) hizo un estudio de caracterización morfológica en *A. hybridus* y evalúa descriptores como la longitud y ancho de la hoja, el número de días a primera brotación floral, días a 50 % de la floración y la longitud, anchura y peso de 500 semillas. Los datos fueron analizados utilizando métodos estadísticos diversos que calculaban parámetros como las medias, desviación estándar, correlaciones y análisis de conglomerados. Los resultados mostraron una amplia gama de diversidad para la mayoría de los caracteres cuantitativos evaluados. La altura de las plantas varió desde 74.30 hasta 181.00 cm, la longitud de la hoja de 13.90 a 29.40 cm y el ancho de la hoja de 7.00 a 12.40 cm. Las accesiones fueron clasificadas en 4 grupos, demostrando características similares. Los grupos podrían servir como líneas de mejora para programas de mejoramiento genético de *A. hybridus* a través de cruzamientos.

En general, se ha encontrado que existe gran diversidad para las características agronómicas entre las especies de *Amaranthus* y entre genotipos dentro de la misma especie, y varios genotipos han sido identificados que parecen portar características agronómicas favorables de uso inmediato para la mejora de cultivares (Wu, 2000; Oboh, 2007; Joshi *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

BIBLIOGRAFÍA

Abarca G., C. A. y López V., A. 2007. La estimación de la endogamia y la relación entre la tasa de fecundación cruzada y los sistemas reproductivos en plantas con flores: una interpretación de su significado. *In*: Ecología

- molecular. Eguiarte, Souza y Aguirre (eds.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. México. pp: 183-213.
- Aguirre P., E. 2007. Genic Flow: methods to estimate it and molecular markers. *In*: Molecular Ecology. Eguiarte, Souza y Aguirre (eds.). México. National Commission for the Knowledge and Use of Biodiversity. pp: 49-61.
- Alejandre, I. G. y Gómez, L. F. 1999. Cultivo de Amaranto en México. Dirección de Difusión Cultural. Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Zonas Áridas. México. 245 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.
- Cárdenas R., F. 1983. Logros y aportaciones de la investigación agrícola de recursos genéticos. Publicación Especial No. 106. INIA-SARH. 17 p.
- Chan, K. F. and Sun, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 95:865 -873.
- De Vicente, M. C. y Fulton, T. 2004. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Módulo de Aprendizaje. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome, Italy. http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Molecular_Markers_Volume_1_es_04.pdf. Consultado el 15 de noviembre de 2014.

De Vicente, M. C.; López, C. and Fulton, T. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Módulo de aprendizaje. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome, Italy.

http://www.bioversityinternational.org/uploads/tx_news/Molecular_Markers_Volume_2_es_04.pdf. Consultado el 15 de noviembre de 2014.

Eguiarte, L. E.; Aguirre P., E.; Scheinvar, E.; González G., A. y Souza, V. 2010. Flujo génico, diferenciación y estructura genética de las poblaciones, con ejemplos en especies de plantas mexicanas. Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental. Departamento de Ecología Evolutiva. Instituto de Ecología. Universidad Nacional Autónoma de México. <http://www.ecotips.com.mx/Bioconservacion/EguarteFlujogenetico.pdf>. Consultado el 19 de noviembre de 2014.

Espitia R., E.; Mapes S., C.; Escobedo L., D.; De la O., M.; Rivas V., P.; Martínez T., G.; Cortés E., L. y Hernández C., J. M. 2010. Conservación y uso de los recursos genéticos de Amaranto en México. INIFAP. Centro de Investigación Regional Centro. Celaya, Guanajuato. México. 200 p.

Espitia R., E. 1987. Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de *Amaranthus*. Coloquio Nacional de Amaranto. Resumen. Programa- Amaranto. CAEVAMEX-CIFAPMEX-INIFAP. Chapingo, Méx. 118 p.

- Fatinah, A. A.; Arumingtyas, E. L. and Mastuti, R. 2012. Genetic Diversity Study Among Six Genera of Amaranth Family Found in Malang Based on RAPD Marker. *Journal of Tropical Life Science* 2(3):81–86.
- Feine, B.; Harwood, R. R.; Kauffman, C. S. and Senft, J. P. 1979. Amaranth: gentle giant of the past and future. *In: New Agricultural Crops*. Gary A. Ritchie (ed.) A. A. A. S. Selected Symposium Series. Westview Press, Inc. U.S.A. pp: 41-63.
- González, A. y Aguirre, X. 2007. Inter Simple Sequence Repeats (ISSRs). *In: Ecología molecular*. Eguiarte, L. E.; Souza, V. y Aguirre, X. (ed). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. UNAM. México. pp: 567–571.
- Grubben G., J. H. and Van Sloten, D. H. 1981. Genetics resources of amaranths International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 57 p.
- Gupta, V. K. and Gudu, S. 1991. Interspecific hybrids and possible phylogenetic relations in grain amaranths. *Euphytica* 52:33-38.
- Hamrick, J. and Godt, H. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *In: Conservation genetics: case histories from nature*. Avise, J. C. and Hamrick, J. L. (eds.). Chapman and Hall. New York. pp: 281-304.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). 2003. Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. pp: 2-26.

- Huerta O., J. A.; Briones C., E. P.; Mendoza H., G.; De León R., A. and Barba de la R., A. P. 2009. Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Science* 170: 990-998.
- Hunter, M. L. and Sulzer. A. 1996. Genetic diversity. *In*: Fundamentals of conservation biology. Hunter Jr., M. L. and Sulzer, A. (eds.). Blackwell Science. Cambridge, MA. pp: 79-103.
- Hunziker, A. T. 1991. Sinopsis de las especies silvestres de *Amaranthus* del continente americano, con especial referencia a las monoicas. Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos. México. 22 p.
- Jacobsen, S. E. and Shewood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. FAO-Centro Internacional de la Papa-Catholic Relief Service. Quito, Ecuador. 14 p.
- Jaramillo, S. y Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación ex situ de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. 128 p.
- Joshi, V.; Vijaya, M.; Sireesha, K. and Madhavi L., P. 2011. Characterization and preliminary evaluation of Vegetable amaranth (*Amaranthus spp.*). *Vegetable Science* 38(2):239-240.
- Kauffman, C. S. and Reider. C. 1984. Rodale Amaranth Germplasm Collection. Rodale Press Inc. Emmaus, PA. 81 p.

- Kauffman, C. S. and Weber, L. E. 1990. Grain amaranth. *In*: Advances in new crops. Janick, J. and Simon, J. E. (eds.). Timber Press. Portland, OR. pp: 127-139.
- Lanoue, K. Z.; Wolf, P. G.; Browning, S. and Hood, E. E. 1996. Phylogenetic analysis of restriction-site variation in wild and cultivated *Amaranthus* species (Amaranthaceae). Theoretical and Applied Genetics 93:722-732.
- Legaria S., J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus spp.*). Revista Fitotecnia Mexicana 33(2):89-95.
- Mallet, J. 1996. The genetics of biological diversity: from varieties to species. *In*: Biodiversity: a biology of numbers and difference. Gaston, K. J. (ed.). Oxford University Press. Oxford. pp: 41-57.
- Mandal, N. and Das P, K. 2002. Intra- and Interspecific Genetic Diversity in Grain *Amaranthus* Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Plant Tissue Culture 12(1):49-56.
- Mapes, C. 2001. Asignación de biomasa en tres colectas de amaranto (*Amaranthus spp.*) con diferente grado de manejo. 159-189. *In*: Plantas, cultura y sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI. Rendón, A. B.; Rebollar, D. S.; Caballero, N. J. y Martínez A., M. A. 2001. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 317 p.

- Moreno L., A. 2007. Tamaño efectivo de la población. *In*: Ecología molecular. Eguiarte, L. E.; Souza, V. y Aguirre, X. (eds.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. UNAM. México. pp: 63-86.
- Moreno, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T Manuales y Tesis SEA, Vol. 1. Zaragoza. España. 84 p.
- Mujica, A.; Berti, M. e Izquierdo, J. 1997. El cultivo del amaranto (*Amaranthus spp.*): producción, mejoramiento genético y utilización. Perú. Universidad Nacional del Altiplano. Perú-Universidad de Concepción. Chile-Oficina regional de la FAO para América Latina y el Caribe. 145 p.
- Oboh, B. 2007. Multivariate Analysis of the Diversity among Some Nigerian Accessions of *Amaranthus hybridus*. International Journal of Plant Breeding and Genetics 1(2):89-94.
- Omamt, E. N.; Hammes, P. S. and Robbertse, P. J. 2006. Differences in salinity tolerance for growth and water-use efficiency in some amaranth (*Amaranthus spp.*) genotypes. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 34:11-22.
- Ornelas U., R. 1981. Contribución al conocimiento del género *Amaranthus* en el Estado de Jalisco. Cuaderno de divulgación 3. Universidad de Guadalajara. Ciencias Medico Biológicas. 31 p.
- Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *In*: Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la

- biodiversidad. Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente B., J. (eds.). CONABIO. México. pp: 437-494.
- Piñero, D. 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *In*: Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente B., J. (eds.). CONABIO. México. pp: 415-435.
- Popa, G.; Cornea, C. P.; Ciuca, M.; Babeanu, N.; Popa, O. and Marin, D. 2010. Studies On Genetic Diversity In *Amaranthus* Species Using The RAPD Markers. *Analele Universității din Oradea-Fascicula Biologie* 17(2):280-285.
- Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
- Rentería A., M. 2007. Breve revisión de los marcadores moleculares. *In*: Ecología molecular. Eguiarte, L. E., Souza, V. y Aguirre, X. (eds.). Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. UNAM. México. pp: 541–566.
- Rodríguez, P. y Vázquez D., E. 2003. Escalas y diversidad de especies. *In*: Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía. Morrone, J. J. y Llorente, J. (eds.). Facultad de Ciencias. UNAM. México. pp: 109-114.
- Ruiz H., V. C.; De la O O., M.; Espitia R., E.; Sangerman J., D. M.; Hernández C., J. M. y Schwentesius R., R. 2013. Variabilidad cualitativa y cuantitativa de accesiones de amaranto determinada mediante caracterización morfológica. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(5):789-801.

- Sánchez Del P., I.; Olvera F., H. y Valdés, J. 1999. La familia Amaranthaceae en la Flora Halófila y Gipsófila de México. *Anales del instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. Serie Botánica* 70(1):29-135.
- Sánchez, M. A. 1980. Potencialidad Agroindustrial del Amaranto. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México, D.F. 238 p.
- Sauer, J. D. 1950. Amaranth as dye plants among the Pueblo peoples. *Southwestern Journal of Anthropology* 6(4):412-415.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: a revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54:102–137.
- Slatkin, M. 1985. Gene flow in natural populations. *Annual Review of Ecology and Systematics* 16:393-430.
- Slatkin, M. 1994. Gene flow and population structure. *In: Ecological Genetics* (ed. Real LA). Princeton University Press. USA. pp: 3 -18.
- Solbrig, O. T. 1991. From genes to ecosystems: a research agenda for biodiversity. IUBSSCOPE-UNESCO. Cambridge. USA. 124 p.
- Stallknecht, G. F. and Schulz S., J. R. 1993. Amaranth rediscovery. *In: New Crops*. Janick, J. y Simon, J. E. (eds.). John Wiley and Sons. New York. pp: 211-218.

- Tapia, M. 1997. Cultivos andinos sub-explotados y su aporte a la alimentación. 2ª Edición. FAO, Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago, Chile. 205 p.
- Transue, D. K.; Fairbanks, D. J.; Robison, L. R. and Andersen, W. R. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain Amaranth genetic resources. *Crop Science* 34:1385-1389.
- Williams, J. T. and Brenner, D. 1995. Grains amaranth (*Amaranthus spp.*). In: *Cereals and pseudo cereals*. Williams, J. T. (ed.). Chapman and Hall. London. pp: 129-186.
- Wu, H. X.; Sun, M.; Yue, S. X.; Sun, H. L.; Cai, Y. Z.; Huang, R. H.; Brenner, D. and Corke, H. 2000. Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(1):43–53.

I. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE ESPECIES CULTIVADAS Y SILVESTRES DE AMARANTO (*Amaranthus spp.*).

RESUMEN

Ha sido difícil establecer relaciones genéticas entre las diferentes especies de amaranto con base en características morfológicas ya que estas presentan variación fenotípica causada en parte por el factor ambiental. Para tratar de resolver éste problema se emplearon marcadores moleculares basados en polimorfismos en las secuencias de ADN que no son afectados por el ambiente. En el presente estudio se utilizaron 25 accesiones nacionales de amaranto provenientes del Programa de Recursos Genéticos del INIFAP y 21 iniciadores tipo ISSR. Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo. Mediante el programa NTSYS Versión 2.2 se calculó una matriz de similitud mediante el Coeficiente de Jaccard. Se evaluó un total de 334 *loci* de los que 327 mostraron polimorfismo. El porcentaje de polimorfismo por iniciador estuvo en un rango de 90.5 % a 100 %. Las especies cultivadas *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* estuvieron genéticamente más relacionadas entre sí, que con respecto a las silvestres. Las especies silvestres genéticamente más relacionadas fueron *A. hybridus* y *A. powellii*, que presentaron cierta relación con las especies cultivadas, probablemente debido a que junto con *A. retroflexus* se consideran los posibles progenitores de las especies de grano cultivadas. Las especies silvestres genéticamente más distantes de todas la especies en estudio fueron *A. spinosus* y *A. palmeri*.

INTRODUCCIÓN

El amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) es una especie importante utilizada para la producción de grano. México es su principal centro de origen y se le ha cultivado desde tiempos de los aztecas; actualmente se sigue cultivando y se encuentra ampliamente distribuida en el país. También se reporta su cultivo en la región del Himalaya en Nepal y en el sur de la India donde se han formado centros secundarios de diversificación (Sauer, 1967; Sánchez, 1980).

Otra especie de amaranto cultivada interesante también por su producción de grano es *A. cruentus*. Según Grubben y Sloten (1981) el origen de *A. cruentus* es la América Central, probablemente Guatemala y el sureste de México, donde se cultiva y se encuentra ampliamente distribuida. Sánchez (1980) menciona que esta especie se ha extendido por Centroamérica y Panamá y ha sido introducida en algunos países de Europa y Asia. Se cultiva para grano solamente en tres regiones de Guatemala y como ornamental en muchas partes del mundo.

La tercera especie de amaranto cultivada es *A. caudatus*, que presenta un fotoperiodo de días cortos y se adapta mejor que las otras especies cultivadas a las bajas temperaturas, fue descrita originalmente en Perú (Sánchez, 1980), es originaria de los Andes y de ahí se distribuyó a otras zonas templadas y subtropicales (Grubben y Sloten, 1981).

Sauer (1967, 1976) ha propuesto dos hipótesis para explicar el origen evolutivo de los amarantos de grano. La primera se basa en la geografía y sugiere que los tres amarantos de grano cultivados evolucionaron de forma independiente. La segunda hipótesis se basa en características de la planta y la morfología de la semilla y

establece que *A. hybridus* dio lugar a *A. cruentus*, que a su vez hibridó con *A. powellii* y *A. quitensis* para originar a *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, respectivamente. En trabajos más recientes, Mallory *et al.* (2008), plantean que las tres especies domesticadas se originaron a partir de antepasados diversos de *A. hybridus*.

Ha sido difícil establecer relaciones genéticas entre las diferentes especies de amaranto con base en características morfológicas ya que éstas presentan variación fenotípica causada en parte por el factor ambiental. La variación fenotípica es el resultado de la interacción entre los factores genéticos y ambientales. Actualmente, para resolver este problema se emplean marcadores moleculares basados en polimorfismos en las secuencias de ADN que no son afectados por el ambiente. Un tipo de marcador molecular que es ampliamente utilizado para la detección de la variación genética son los RAPD (Polimorfismos en el ADN Amplificados al Azar, por sus siglas en inglés). Los RAPD se utilizan para la detección de polimorfismos y son útiles para identificar un gran número de *loci* y para establecer relaciones genéticas entre diferentes taxones (Fatinah *et al.*, 2012).

También, mediante el uso de otras herramientas moleculares se han realizado estudios para determinar el número de cromosomas y la fertilidad de híbridos (Gupta y Gudu, 1991), la identificación de especies (Transue *et al.*, 1994) y análisis filogenéticos (Lanoue *et al.*, 1996), que han aclarado algunos aspectos sobre la diversidad genética y las relaciones evolutivas entre los amarantos de grano y sus parientes silvestres. Estos estudios han permitido el planteamiento de

algunas hipótesis acerca del origen geográfico de las especies de amaranto y establecer vínculos filogenéticos entre ellas. Además, se han hecho una serie de pruebas para la caracterización molecular de germoplasma con el fin de generar resultados útiles para los mejoradores. A pesar de los avances que se tienen, actualmente no se cuenta con un método único de caracterización que permita diferenciar a las especies de manera inequívoca utilizando un marcador molecular particular (Rao, 2004). En los últimos años, se ha prestado especial atención a examinar las variaciones de las secuencias amplificadas usando marcadores AFLP, SSR, ISSR o secuencias de todo el genoma.

En general, los estudios realizados indican que existe gran diversidad en las características morfológicas y agronómicas entre las especies de *Amaranthus* y entre los genotipos dentro de la misma especie, y se han identificado varios genotipos con características agronómicas favorables de uso inmediato para la mejora de los cultivares (Wu, *et al.*, 2000; Oboh, 2007; Joshi *et al.*, 2011; Ruiz *et al.*, 2013).

Durante los últimos años la conservación de especies vegetales ha tomado gran importancia, debido a la concientización del ser humano por la necesidad de preservar sus recursos genéticos, conocer la variabilidad y diversidad genética de estos, así como establecer sus relaciones filogenéticas, para proponer estrategias de conservación *ex situ* e *in situ* y hacer un uso racional de los mismos. Por estas razones el objetivo de la presente investigación fue la caracterización molecular de especies cultivadas y silvestres de amaranto y establecer sus relaciones genéticas.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudiaron 25 accesiones nacionales de amaranto provenientes del programa de Recursos Genéticos del INIFAP, Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, municipio de Texcoco, México (Cuadro 1).

Cuadro 1. Lista de accesiones de amaranto utilizadas, correspondientes a especies cultivadas y silvestres.

Especie	Accesión	Abreviación
<i>A. hypochondriacus</i>	Tlax-089	THYP
	Revancha	RHYP
	Nutrisol	NHYP
	Pue-027	PHYP
<i>A. cruentus</i>	Gto-078	78CRU
	Gto-092	92CRU
	Mor-041	41CRU
	Mor-042	42CRU
<i>A. hybridus</i>	Silv-28	28HYB
	Silv-39	39HYB
	Silv-43	43HYB
	Silv-44	44HYB
<i>A. retroflexus</i>	Silv-40	40RETR
	Silv-26	26RETR
	Silv-34	34RETR
	Silv-38	38RETR

Cuadro 1. (Continuación...)

Especie	Accesión	Abreviación
<i>A. powellii</i>	Silv-46	46POW
	Silv-48	48POW
	Silv-49	49POW
	Silv-50	50POW
<i>A. palmeri</i>	Silv-27	27PALM
	Silv-33	33PALM
	Silv-35	35PALM
	Silv-36	36PALM
<i>A. spinosus</i>	Silv-47	47SPIN

Para la obtención del material vegetal, se sembraron semillas en 10 vasos de unisel por accesión, dejando crecer de tres a cinco plantas por vaso para la extracción del ADN. Se utilizaron plantas jóvenes y visiblemente libres de enfermedades y patógenos y que presentaran las características propias de la especie (Figura 1).

Purificación de ADN

La purificación del ADN se hizo de acuerdo al protocolo de De la Cruz *et al.* (1997), con algunas modificaciones. Se tomaron hojas jóvenes (0.3 g) y se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Este polvo se transfirió a un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL que contenía 600 µL de amortiguador de extracción (20 mL Tris-HCL 1 M, pH 8.0; 20 mL EDTA 0.5 M, pH

8.0; 20 mL NaCl 5 M; 35 μ L β -Mercaptoetanol; 40 mL dodecil sulfato de sodio 20 %) y se incubó a 65 °C por 10 min con ayuda de un Standard Heatblock de VWR®Scientific Products, con inversión ocasional de los tubos.



Figura 1. Plantas de amaranto sembradas en vasos de unicel, utilizadas para la purificación del ADN.

Después, se adicionó 200 μ L de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a 0 °C. Se centrifugó a 15000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 700 μ L de isopropanol frío (-20 °C). Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por 30 min, después se centrifugó por 5 min a 10000 x *g* a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 200 μ L de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA- Na_2 10 mM, pH 8.0), y se agitó suavemente hasta diluir bien el precipitado.

Se añadió 2 μL de ARNasa A y con ayuda de un horno Felisa® se incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionó 20 μL de acetato de sodio 3M más 200 μL de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 horas. Se centrifugó a 10000 $\times g$ por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 300 μL de etanol a 70 %. La pastilla se secó y se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA- Na_2 1 mM, pH 8.0) y por último se almacenó a 4 °C.

La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 UV Scanning® (Thermo Scientific). El ADN se utilizó en subsecuentes reacciones de PCR.

Reacción de PCR

Se ajustó la concentración de ADN de cada muestra a 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$, cantidad suficiente para la amplificación de patrones tipo ISSR. Se usaron 21 iniciadores (Cuadro 2). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 μL , que incluyó 3.2 μL de agua doble destilada estéril, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM, pH 8.8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 2.0 μL de MgCl_2 (25 μM); 3.0 μL de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3 μL de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de 5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$; y 4.0 μL de ADN genómico a una concentración de 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne®28 TC-512.

Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 50 °C por un minuto, Extensión a 72 °C por 2 min y una extensión final de 10 min a 72 °C, con un total de 30 ciclos (Figura 2).

Cuadro 2. Iniciadores ISSR utilizados durante la caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de amaranto.

Iniciador ISSR	Secuencia
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC- 3'
A4	5'-CACACACACACACACAAG- 3'
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGA- 3'
P1	5'-GAGCAACAACAACAACA- 3'
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGTG- 3'
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'
RAH-04	5'-AAAGCTGCGG- 3'
IAH-01	5'-ACACACACACACA- 3'
IAH-02	5'-GTGTGTGTGTGTGG- 3'
IAH-03	5'-GAGAGAGAGAGAGACC- 3'
IAH-04	5'-CACCACCACGC- 3'
IAH-05	5'-GAGGAGGAGGC- 3'
ISSR 01	5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG- 3'
ISSR 03	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'
ISSR 04	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'
(AG) 8YA	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGGYA- 3'

Cuadro 2. (Continuación...)

Iniciador ISSR	Secuencia
AG8C	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC- 3'
U873	5'-GACAGACAGACAGACA- 3'
U848	5'-CACACACACACACACARG

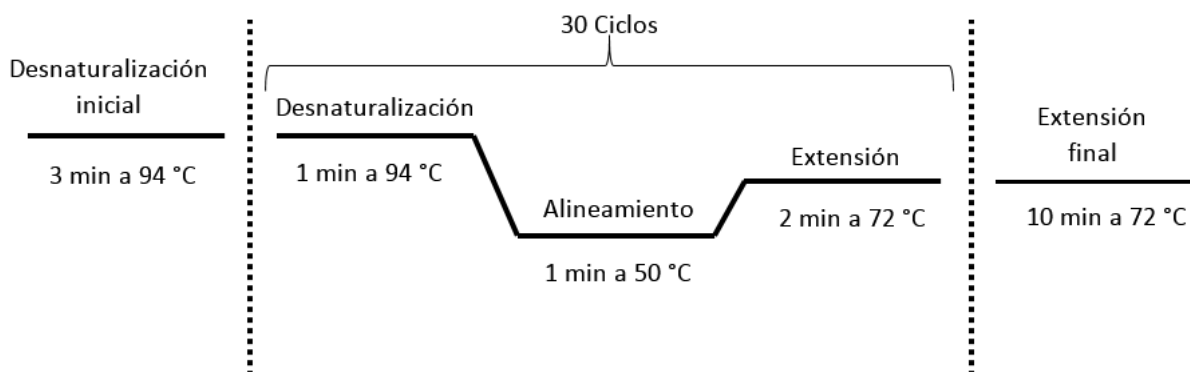


Figura 2. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne®28TC-512.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂ EDTA), por 1 h a 120 V. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 12 µL del producto de la reacción de PCR agregando 1 µL de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xilen cianol, 30 % de Ficoll y 1 % de SDS). Como referencia se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg.mL⁻¹) por 5 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua 5 min y se documentaron

con ayuda del equipo Kodak® High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290, bajo luz UV.

Análisis estadístico de los datos

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo, asignando un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, asumiendo que bandas de igual peso molecular son idénticas entre especies, y se construyó una Matriz Básica de Datos (MBD).

Empleando la MBD y mediante el programa NTSYS Versión 2.2 (Rohlf, 2000), se calculó una matriz de similitud mediante el Coeficiente de Jaccard (CJ) (Jaccard, 1908). Con los datos resultantes se realizó un análisis de conglomerados por el método de medias aritméticas (UPGMA, *Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average*; Sneath y Sokal, 1973) y se generó el dendrograma correspondiente.

Se hizo un re-muestreo (de 1000 fenogramas posibles) mediante *Bootstrapping* con el programa Free Tree Versión 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001) y se visualizó en el software Tree View Version 1.6.6 (Hampl *et al.*, 2001).

RESULTADOS

Se evaluó un total de 334 *loci* de los que 327 mostraron polimorfismo. El porcentaje de polimorfismo por iniciador estuvo en un rango de 90.5 a 100 %. El

número promedio de bandas amplificadas por iniciador fue de 15.9, con un mínimo de 7 y un máximo de 27 (Cuadro 3).

Los iniciadores utilizados amplificaron un número adecuado de bandas polimórficas, de apariencia clara y nítida entre las accesiones y especies de amaranto, como se muestra en las Figuras 3 y 4.

Cuadro 3. Lista de iniciadores, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de polimorfismo detectados.

Iniciador ISSR	Secuencia	Productos amplificados	Polimorfismo %
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC- 3'	14	92.8%
A4	5'-CACACACACACACACAAG- 3'	16	100%
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'	17	94.1%
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA- 3'	13	100%
P1	5'-GAGCAACAACAACAACAA- 3'	16	100%
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'	17	94.1%
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG- 3'	11	100%
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG- 3'	7	100%
RAH-04	5'-AAAGCTGCGG- 3'	13	100%
IAH-01	5'-ACACACACACACA- 3'	14	92.8
IAH-02	5'-GTGTGTGTGTGTGG- 3'	12	100%
IAH-03	5'-GAGAGAGAGAGACC- 3'	13	100%
IAH-04	5'-CACCACCACGC- 3'	18	94.4%
IAH-05	5'-GAGGAGGAGGC- 3'	18	100%
ISSR 01	5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG- 3'	15	100%

Cuadro 3. (Continuación...)

Iniciador ISSR	Secuencia	Productos amplificados	Polimorfismo %
ISSR 03	5'-AGAGAGAGAGAGAGT- 3'	17	100%
ISSR 04	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'	27	100%
(AG) 8YA	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA- 3'	15	100%
AG8C	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGC- 3'	21	90.5%
U873	5'-GACAGACAGACAGACA- 3'	21	100%
U848	5'-CACACACACACACACARG- 3'	19	100%

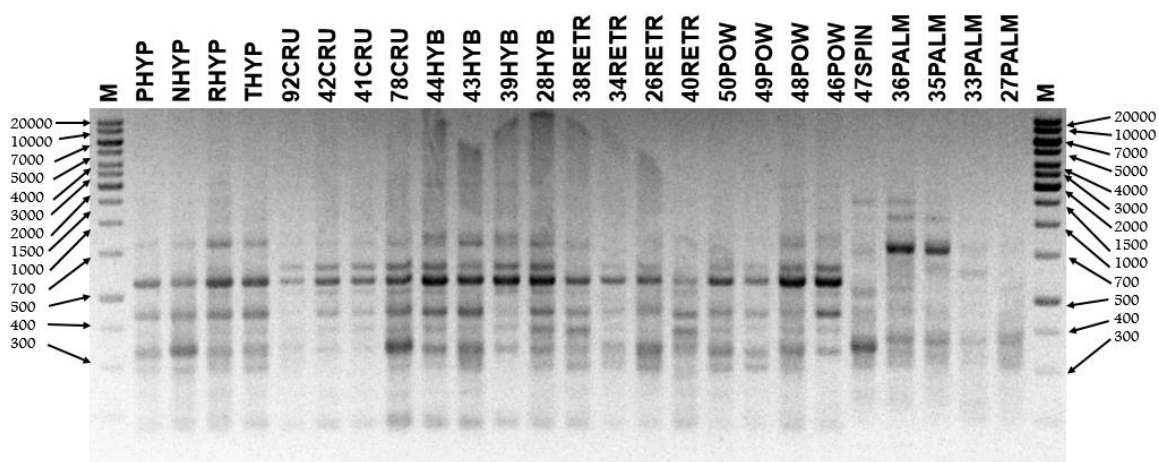


Figura 3. Patrones de bandas obtenidas con el iniciador (AG) 8YA para las accesiones de *Amaranthus*. M, marcador de peso molecular.

Caracterización molecular

El dendrograma de relaciones genéticas entre las accesiones de amaranto pertenecientes a diferentes especies del género *Amaranthus* (Figura 5), permitió observar la formación de cinco grupos a un coeficiente de Jaccard igual a 0.445, el grupo I se divide en dos subgrupos, uno integrado por las accesiones de la

especie *A. hypochondriacus* (PHYP, NHYP, RHYP y THYP) y el segundo formado con las accesiones de la especie *A. cruentus* (92CRU, 78CRU, 41CRU y 42CRU).

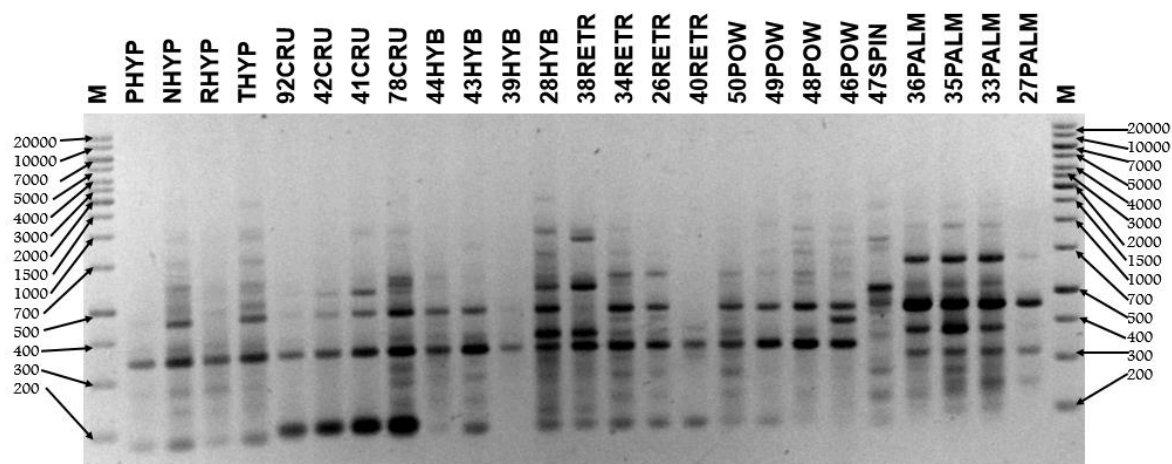


Figura 4. Patrones de bandas obtenidas con el iniciador ISSR4 para las accesiones de *Amaranthus*. M, marcador de peso molecular.

El grupo II se formó con materiales silvestres y se divide en dos subgrupos, el primero lo forman materiales de la especie *A. hybridus* (44HYB, 43HYB, 39HYB y 28HYB) más un material de la especie *A. retroflexus* (38RETR), mientras que el segundo lo integraron materiales de las especies *A. retroflexus* (34RETR y 26RETR) y *A. powellii* (50POW, 49POW, 48POW y 46POW). El grupo III lo formó una accesión de *A. retroflexus* (40RETR). El grupo IV se formó con la accesión de *A. spinosus* (47SPIN) y el grupo V lo integraron todos los materiales de *A. palmeri* (36PALM, 35PALM, 33PALM y 27PALM) (Figura 5).

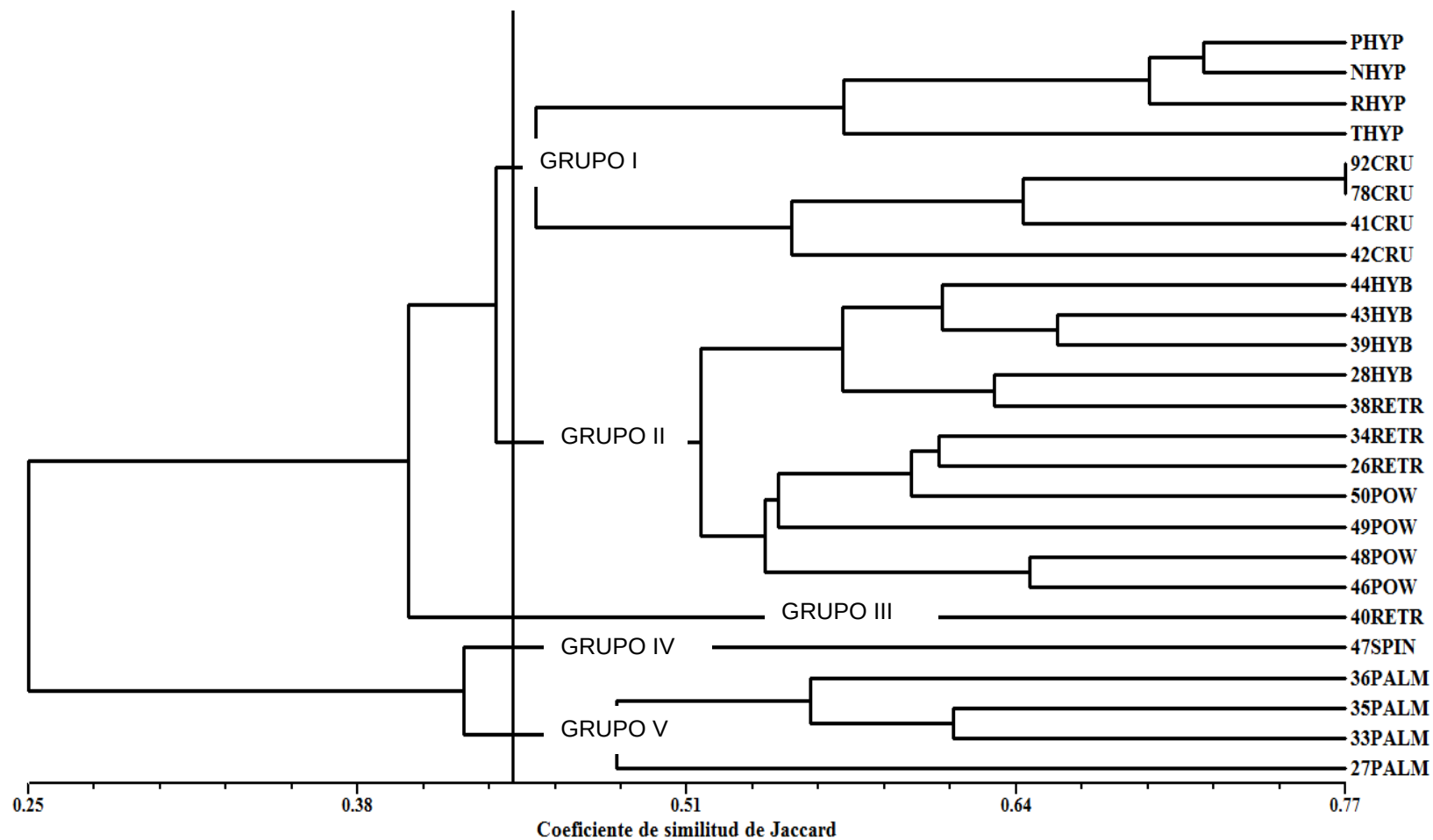


Figura 5. Dendrograma de relaciones entre 25 accesiones de *Amaranthus*, obtenido con datos de ISSR.

El promedio de similitud para los materiales de *A. hypochondriacus* fue de 0.6362, con un rango de 0.5507 a 0.7143, donde los materiales más alejados fueron las accesiones THYP y PHYP, y los más idénticos son NHYP y PHYP. Los materiales de *A. cruentus* tuvieron un promedio de similitud de 0.6186 y un rango de 0.5135 a 0.7704, los materiales más alejados entre ellos fueron 78CRU y 42CRU, mientras los más idénticos fueron 78CRU y 92CRU.

Los materiales genéticamente más idénticos entre todos los evaluados fueron las accesiones 92CRU y 78CRU con un coeficiente de similitud de Jaccard de 0.7704 y ambos pertenecen a *A. cruentus*; mientras que los genéticamente más alejados fueron los correspondientes a *A. palmeri* (33PALM) y *A. cruentus* (42CRU) con un coeficiente de 0.1818 (Cuadro 4).

Al nivel de especies se encontró que las genéticamente más distantes fueron *A. spinosus* (47SPIN) y *A. palmeri* (36PALM, 35PALM, 33PALM Y 27PALM) con un coeficiente de similitud promedio de 0.2720 (Cuadro 4).

Remuestreo

Con el uso del programa Free Tree Versión 0.9.1.50 (Hampl *et al.*, 2001) y el coeficiente de Jaccard se obtuvo un árbol robusto luego de 1000 re-muestreos (Figura 6). El dendrograma obtenido mostró la formación de cuatro grupos. El grupo I se formó con la accesión de *A. retroflexus* (40RETR).

Cuadro 4. Coeficientes de similitud de Jaccard entre las accesiones de *Amaranthus* evaluadas.

Accesión	PHYP	NHYP	RHYP	THYP	92CRU	42CRU	41CRU	78CRU	44HYB	43HYB	39HYB	28HYB	38RETR	34RETR	26RETR	40RETR	50POW	49POW	48POW	46POW	47SPIN	36PALM	35PALM	33PALM
PHYP	1																							
NHYP	0.7143	1																						
RHYP	0.6772	0.709	1																					
THYP	0.5507	0.6084	0.558	1																				
92CRU	0.4564	0.4841	0.4248	0.4129	1																			
42CRU	0.4638	0.4437	0.4196	0.4783	0.5221	1																		
41CRU	0.4658	0.4839	0.4828	0.4595	0.6591	0.619	1																	
78CRU	0.4356	0.4706	0.4072	0.4217	0.7704	0.5135	0.6276	1																
44HYB	0.3882	0.3926	0.359	0.3742	0.4305	0.3767	0.469	0.4654	1															
43HYB	0.4305	0.45	0.4467	0.4156	0.4444	0.3919	0.4932	0.4875	0.6045	1														
39HYB	0.449	0.4403	0.4362	0.3694	0.4631	0.4097	0.4828	0.4506	0.6183	0.6565	1													
28HYB	0.3851	0.4044	0.407	0.3807	0.4386	0.3832	0.4817	0.5029	0.6107	0.5806	0.6463	1												
38RETR	0.454	0.4294	0.4251	0.4311	0.4847	0.4012	0.4753	0.4885	0.5032	0.5449	0.5455	0.6319	1											
34RETR	0.4189	0.3865	0.3974	0.4133	0.4052	0.3986	0.5035	0.441	0.5368	0.5735	0.518	0.5127	0.5772	1										
26RETR	0.4049	0.4244	0.3939	0.3916	0.4356	0.3774	0.462	0.4852	0.52	0.5743	0.5753	0.5357	0.5301	0.6099	1									
40RETR	0.3277	0.3495	0.3642	0.3466	0.3714	0.3158	0.4107	0.3967	0.3684	0.4311	0.4132	0.4348	0.4444	0.4654	0.4483	1								
50POW	0.3636	0.3951	0.3701	0.3766	0.4052	0.3793	0.4521	0.4233	0.4929	0.597	0.5515	0.5127	0.5064	0.5878	0.6099	0.4383	1							
49POW	0.4641	0.5094	0.4423	0.5479	0.5066	0.4459	0.5168	0.5092	0.4295	0.5302	0.4901	0.454	0.491	0.4899	0.5752	0.4195	0.5745	1						
48POW	0.4575	0.5127	0.4737	0.4241	0.434	0.3654	0.461	0.4497	0.4231	0.5235	0.4641	0.4318	0.4335	0.5034	0.4815	0.4138	0.4832	0.4873	1					
46POW	0.4214	0.4756	0.4012	0.425	0.4437	0.4118	0.5	0.4762	0.5411	0.5646	0.5764	0.5269	0.4852	0.5775	0.5987	0.4477	0.6115	0.5867	0.6458	1				
47SPIN	0.2593	0.27	0.2646	0.2903	0.2723	0.2391	0.2834	0.2871	0.2474	0.267	0.2579	0.2837	0.2524	0.2826	0.3492	0.305	0.2896	0.3369	0.2835	0.3404	1			
36PALM	0.2759	0.2526	0.2599	0.224	0.2541	0.2695	0.2584	0.2708	0.221	0.2486	0.289	0.2488	0.2475	0.2155	0.2646	0.2827	0.2571	0.2649	0.2199	0.2688	0.4253	1		
35PALM	0.25	0.2552	0.2556	0.227	0.2637	0.2079	0.2682	0.2667	0.2584	0.2312	0.235	0.2574	0.2255	0.2186	0.2604	0.2784	0.212	0.254	0.2228	0.2646	0.4425	0.5986	1	
33PALM	0.2457	0.2316	0.2303	0.2222	0.2253	0.1818	0.2022	0.2308	0.1989	0.2198	0.2167	0.2108	0.2273	0.2135	0.2703	0.2618	0.2273	0.2568	0.2514	0.2609	0.4438	0.52	0.6154	1
27PALM	0.275	0.2571	0.2813	0.241	0.2011	0.205	0.2189	0.2216	0.1871	0.2455	0.2349	0.2199	0.2312	0.2317	0.2701	0.2541	0.2393	0.2486	0.2874	0.2457	0.3772	0.4362	0.4091	0.6031

El grupo II se divide en dos subgrupos, el primero con accesiones de *A. powellii* (49POW, 50POW, 46POW y 48POW) y *A. retroflexus* (26RETR y 34RETR), y el segundo con genotipos de *A. hybridus* (44HYB, 39HYB, 43HYB, 28HYB) y un material de *A. retroflexus* (38RETR).

El grupo III también se dividió en dos subgrupos, el primero formado con los materiales de *A. cruentus* (42CRU, 41CRU, 78CRU, 92CRU), y el segundo incluyó accesiones de *A. hypochondriacus* (THYP, RHYP, NHYP, PHYP). El grupo IV integró a accesiones de *A. palmeri* (27PALM, 36PALM, 33PALM, 35PALM) y la de *A. spinosus* (47SPIN).

Tanto el dendrograma obtenido con el programa NTSYS pc versión 2.2 (Figura 5) como el obtenido usando el programa FreeTree con 1000 re-muestreos (Figura 6), mostraron evidente separación entre los materiales cultivados y los silvestres, y entre estos últimos hubo diferencia clara entre los materiales dioicos (*A. palmeri*) y el material que presenta espinas (*A. spinosus*) que agruparon de forma separada con respecto a los demás materiales silvestres.

Los resultados del análisis de escalado multidimensional (MDA) de las 25 accesiones de amaranto con uso de marcadores del tipo ISSR, se muestra en la Figura 7. En ésta se observa la formación de tres grupos. El primer grupo incluyó a los materiales dioicos de *A. palmeri* (36PALM, 35PALM, 33PALM, 27PALM), el segundo lo formó el material de *A. spinosus* (47SPIN) y el tercero lo integraron el resto de los materiales correspondientes *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. powellii*, *A. retroflexus* y *A. hybridus*.

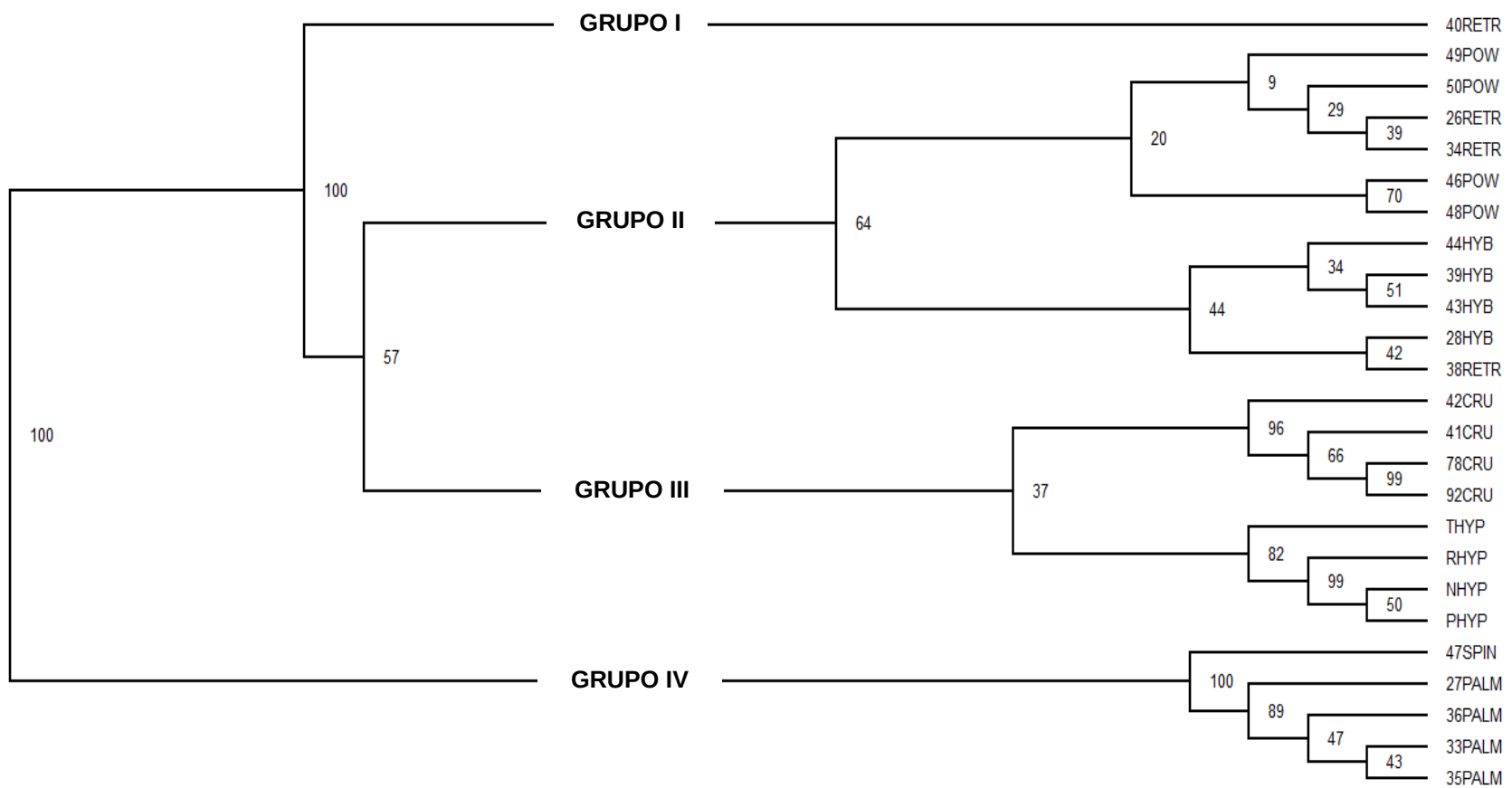


Figura 6. Dendrograma de relaciones entre accesiones de *Amaranthus* obtenido con datos de ISSR, con 1000 re-muestreos.

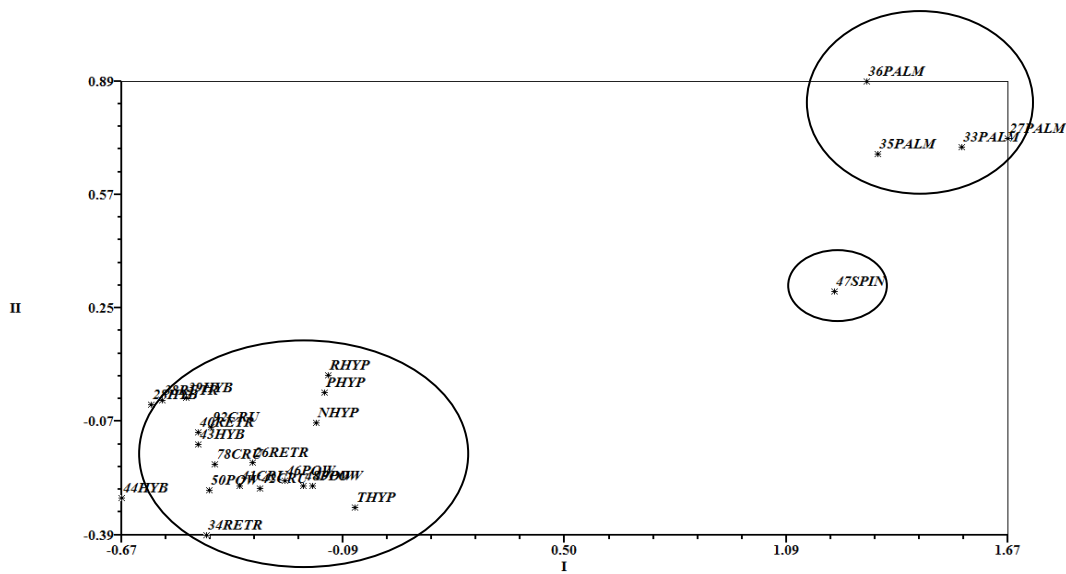


Figura 7. Gráfica en 2D generada mediante escalado multidimensional y con datos de ISSR para 25 accesiones de amaranto.

En la gráfica tridimensional (Figura 8) se formó un número de grupos igual que en el gráfico de dos dimensiones.

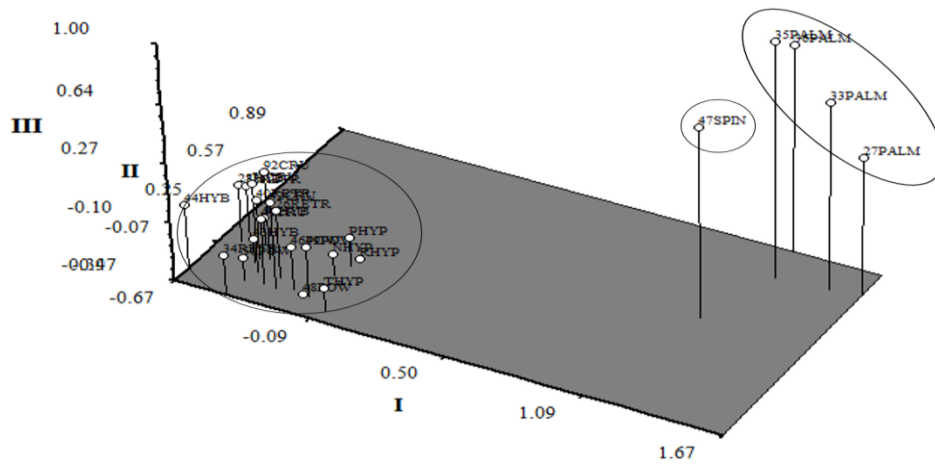


Figura 8. Gráfica en 3D generada mediante escalado multidimensional y usando datos de ISSR para 25 accesiones de amaranto.

DISCUSIÓN

Los estudios de diversidad genética entre las especies de amaranto de grano cultivadas han demostrado mayor grado de similitud genética entre *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras que la más alejada es *A. cruentus* (Transue *et al.* 1994; Chan and Sun, 1997; Mandal y Das, 2002). Al respecto, Legaria (2010) encontró mayor relación entre *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* a un coeficiente de identidad de Nei's de 0.45, esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde los amarantos de grano cultivados (*A. hypochondriacus* y *A. cruentus*) agrupan juntos y se separan claramente de los amarantos silvestres. En estudios comparativos de especies cultivadas y silvestres se ha reportado mayor similitud entre las especies cultivadas que entre las silvestres.

Popa *et al.* (2010) encontró que *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están muy relacionados, mostrando una distancia mínima entre ellos del 18 al 20 %, mientras *A. powellii*, una especie silvestre se relaciona muy distante. También, Ranade *et al.* (1997) reportan una agrupación distante entre *A. spinosus* y *A. lividus* respecto a *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*, encontrándose éstos últimos genéticamente más relacionados. La cercanía genética que se da entre los materiales de grano cultivados y *A. hybridus* es apoyada por una hipótesis establecida por varios autores (Ranade *et al.*, 1997; Mandal y Das, 2002; Ray y Roy, 2008, Mallory *et al.*, 2008; Maughan *et al.*, 2011), quienes sugieren un origen monofilético para los materiales cultivados. Al respecto, Chan y Sun (1997) plantean que los amarantos de grano cultivados deben tener solamente un progenitor y éste es *A. hybridus*.

Por otro lado, Pal y Khoshoo (1972) reportan asociación entre los amarantos cultivados y amarantos silvestres como *A. hybridus* L., *A. quitensis* Kunth y *A. powellii* S. Watson y sugieren que éstos últimos pudieran ser los progenitores de los primeros. Es posible que por ésta razón en el presente trabajo los amarantos silvestres *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*, estén agrupando con los amarantos de grano cultivados *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*.

CONCLUSIONES

Los marcadores moleculares del tipo ISSR permitieron diferenciar a los amarantos silvestres de los cultivados, así como a las diferentes especies estudiadas. Los marcadores ISSR posibilitaron conocer la diversidad genética presente en el género *Amaranthus* y determinar las relaciones de parentesco entre sus diferentes especies. Las especies cultivadas estuvieron genéticamente más relacionadas entre sí, que con respecto a las silvestres. Las especies silvestres genéticamente más cercanas fueron *A. hybridus* y *A. powellii*, que estuvieron también muy relacionadas con las especies cultivadas, probablemente debido a que junto con *A. retroflexus* se consideran los probables progenitores de las especies de grano cultivadas. Las especies silvestres genéticamente más distantes fueron *A. spinosus* y *A. palmeri*.

BIBLIOGRAFÍA

- Chan, K. F. and Sun, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. Theoretical and Applied Genetics 95:865 -873.
- De la Cruz, M.; Ramirez, F. and Hernández, H. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. Plant Molecular Biology Reporter 15:319-325.
- Fatinah, A. A.; Arumingtyas, E. L. and Mastuti, R. 2012. Genetic diversity study among six genera of Amaranth family found in Malang based on RAPD marker. The Journal of Tropical Life Science 2012:2(3)81–86.
- Grubben G., J. H. and Van Sloten, D. H.1981. Genetics resources of amaranths International Board for Plant Genetic Resources. Rome, Italy. 57 p.
- Gupta, V. K. and Gudu, S. 1991. Interspecific hybrids and possible phylogenetic relations in grain amaranths. Euphytica 52:33-38.
- Hampl, V.; Pavlícek, A. and Flegr, J. 2001. Construction and bootstrap analysis of DNA fingerprinting-based phylogenetic trees with the freeware program Free Tree: application to trichomonad parasites. The International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51:731-735.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise de Science Nature 44:223-70.
- Joshi, V.; Vijaya, M.; Sireesha, K. and Madhavi L., P. 2011. Characterization and preliminary evaluation of Vegetable amaranth (*Amaranthus spp.*). Vegetable Science 38(2):239-240.

- Lanoue, K. Z.; Wolf, P. G.; Browning, S. and Hood, E. E. 1996. Phylogenetic analysis of restriction-site variation in wild and cultivated *Amaranthus* species (Amaranthaceae). *Theoretical and Applied Genetics* 93:722-732.
- Legaria S., J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus spp.*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(2):89-95.
- Mallory, M. A.; Hall, R. V.; McNabb, A. R.; Pratt, D. B.; Jellen, E. N. and Maughan, P. J. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for the grain amaranths. *Crop Science* 48:1098–1106.
- Mandal, N. y Das P. K. 2002. Intra- and interspecific genetic diversity in grain *Amaranthus* using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Plant Tissue Culture* 12(1):49-56.
- Maughan, P. J.; Smith, S. M.; Fairbanks, D. J. and Jellen, E. N. 2011. Development, Characterization, and Linkage Mapping of Single Nucleotide Polymorphisms in the Grain Amaranths (*Amaranthus sp.*). *Plant Genome* 4 (1):92-101.
- Oboh, B. 2007. Multivariate analysis of the diversity among some Nigerian accessions of *Amaranthus hybridus*. *International Journal of Plant Breeding and Genetics* 1(2):89-94.
- Pal, M. and Khoshoo. T. N. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. *Journal of Heredity* 63:78–82.

- Popa, G.; Cornea, C. P.; Ciuca, M.; Babeanu, N.; Popa, O. and Marin, D. 2010. Studies On Genetic Diversity In *Amaranthus* Species Using The RAPD Markers. *Analele Universității din Oradea-Fascicula Biologie* 17(2):280-285.
- Ranade, S. A.; Kumar, A.; Goswami, M.; Farooqui, N. and Sane, P. V. 1997. Genome analysis of amaranths: Determination of inter and intra species variations. *Journal of Biosciences* 22(4):457-464.
- Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology* 3:136-145.
- Ray, T. and Roy, S. C. 2008. Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. *Oxford Journals* 100(3):338-347.
- Rohlf, F. J. 2000. Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software, New York.
- Ruiz H., V. C.; De la O O., M.; Espitia R., E.; Sangerman J., D. M.; Hernández C., J. M. y Schwentesius R., R. 2013. Variabilidad cualitativa y cuantitativa de accesiones de amaranto determinada mediante caracterización morfológica. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(5):789-801.
- Sánchez, M. A. 1980. Potencialidad Agroindustrial del Amaranto. Centro de Estudios Económicos y Sociales del Tercer Mundo. México. 238 p.
- Sauer, J. D. 1967. The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Annals of the Missouri Botanical Garden* 54:103–137.

- Sauer, J. D. 1976. Grain amaranths. *In*: Evolution of crop plants. Simmonds, N. W. (ed.). Longman Group, London, UK. pp: 4-7.
- Transue, D. K.; Fairbanks, D. J.; Robison, L. R. and Andersen, W. R. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain Amaranth genetic resources. *Crop Science* 34(5):1385-1389.
- Wu, H. X.; Sun, M.; Yue, S. X.; Sun, H. L.; Cai, Y. Z.; Huang, R. H.; Brenner, D. and Corke, H. 2000. Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(1):43–53.

II. DIVERSIDAD GENÉTICA DENTRO Y ENTRE POBLACIONES DE AMARANTO (*Amaranthus spp.*) DE MÉXICO USANDO MARCADORES ISSR

RESUMEN

El género *Amaranthus* se distribuye ampliamente en América, mostrando gran variabilidad genética. Conocer la diversidad genética dentro y entre las poblaciones y especies de *Amaranthus* es importante para planear estrategias de conservación para la continuidad de dichas especies y poblaciones. Los enfoques que se han usado para evaluar y entender la variación genética en especies mexicanas incluyen la utilización de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. En el presente estudio se utilizaron 13 accesiones nacionales de amaranto del programa de Recursos Genéticos del INIFAP y 10 iniciadores tipo ISSR. Los materiales se compararon en base a similitudes y diferencias en los patrones de bandeo. Con el programa POPGENE 32 se estimaron parámetros como el porcentaje de *loci* polimórficos, la diversidad genética de Nei, el índice de diversidad de Shannon, el coeficiente de diferenciación entre las poblaciones (G_{ST}), el número de individuos migrantes efectivos y la matriz de distancias e identidades genéticas de Nei (1973). Se estudiaron 154 *loci*, encontrándose que el porcentaje de polimorfismo promedio para los iniciadores fue de 97.9 %. Los amarantos cultivados mostraron estar genéticamente muy relacionados entre sí y con sus posibles progenitores silvestres (*A. hybridus* y *A. powellii*). La mayor parte de la diversidad genética detectable se encontró entre las especies y las accesiones, mientras que la menor parte estuvo dentro de las mismas.

INTRODUCCIÓN

El amaranto es una planta herbácea anual predominantemente tropical que pertenece al género *Amaranthus*. Este género contiene más de 70 especies de las cuales la mayoría son nativas de América y sólo 15 provienen de Europa, Asia, África y/o Australia (Robertson, 1981). Al respecto, Hunziker (1991) estima que en el mundo existen poco menos de 90 especies del género *Amaranthus*, sumando a las 17 encontradas en el viejo mundo, unas 14 australianas y 56 de América, incluyendo en estas últimas unas 10 especies dioicas. En EUA y México existen aproximadamente 29 de dichas especies.

El género *Amaranthus* se distribuye ampliamente en América, mostrando gran variabilidad genética, misma que se aprecia al observar características de la planta como el tipo de inflorescencia, color de semilla, precocidad, contenido proteínico de la semilla y resistencia a plagas y enfermedades. Es un cultivo fácil de establecer pues prospera en regiones de temporal donde los cultivos básicos tienen poco éxito, se adapta a varios tipos de suelo, altitudes, temperaturas y fotoperiodos, así como a diversos requerimientos de pH y precipitación (Mapes, 2001; Jacobsen y Sherwood, 2002).

Dentro del género se encuentran las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* que son las más importantes para la producción de grano de amaranto. Las dos primeras se encuentran ampliamente distribuidas en México, conformando el centro de diversidad más importante (Espitia *et al.*, 2010). El amaranto de grano se considera una excelente alternativa para regiones con dificultades para la siembra de cereales (Omamt *et al.*, 2006; Huerta *et al.*, 2009).

México es considerado un país megadiverso por su elevado número de especies, pero también por su riqueza de endemismos (especies exclusivas de México), de ecosistemas y por la gran variabilidad genética mostrada en muchos grupos taxonómicos, resultado de la evolución o diversificación natural y cultural en el país (Espinosa y Ocegueda, 2008), en su territorio se encuentran entre 4 y 8 % del número de total de especies de plantas del mundo, de las cuales 51 % son endémicas. Por esta razón existe una gran preocupación sobre la conservación de la flora mexicana, ya que se han detectado varias actividades y factores que la amenazan (Sosa y De-Nova, 2012).

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. El resto de la biodiversidad se deriva de los procesos evolutivos que operan sobre esas variaciones. De ahí que su conocimiento y comprensión sea de vital importancia tanto para la conservación y el avance de la genética evolutiva, como para la salud pública, la sustentabilidad y la productividad agrícolas (Piñero, 2008).

Mediante la caracterización de una especie se estima la variabilidad existente en el genoma de la población de individuos que la conforman. Como sucede con todos los organismos vivos que se desarrollan en condiciones naturales, la población de individuos que estructuran una especie vegetal está bajo una continua interacción dinámica de adaptación con los factores en los que crece esa población. El resultado de esta interacción adaptativa se traduce en la

acumulación de la información genética que a manera de variantes cada especie va guardando entre los miembros de su población, y que se va transmitiendo en las subsiguientes generaciones a través del tiempo (Hidalgo, 2003).

Los enfoques que se han usado para evaluar y entender la variación genética en especies mexicanas incluyen la utilización de marcadores de diferente tipo como las isoenzimas, los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), polimorfismos de ADN amplificados aleatoriamente en mayor o menor grado (RAPD y AFLP), repeticiones de secuencias internas (ISSR, por sus siglas en inglés), microsatélites (SSR) y secuencias de ADN (Piñero, 2008a).

El estudio de la diversidad genética dentro y entre poblaciones y especies de *Amaranthus* es importante para planear estrategias de conservación para la continuidad de dichas especies y poblaciones, así como para satisfacer las demandas de los entornos cambiantes a través del mejoramiento genético del amaranto y esto dependerá en gran medida de la magnitud de la variabilidad disponible en su acervo genético. Por lo anterior, el objetivo de la presente investigación fue analizar la diversidad genética dentro y entre las poblaciones y especies de *Amaranthus*, así como comparar identidades genotípicas de los materiales en estudio.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudiaron 13 accesiones nacionales de amaranto, previamente identificados morfológicamente, provenientes del programa de Recursos Genéticos del INIFAP, Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, municipio de Texcoco, México (Cuadro 5).

Cuadro 5. Lista de accesiones utilizadas para el análisis de la diversidad genética en poblaciones de *Amaranthus*.

Especie	Accesión	Abreviatura
<i>A. hypochondriacus</i>	Tlax-089	89HYP
	Pue-027	27HYP
<i>A. cruentus</i>	Gto-092	92CRU
	Mor-042	42CRU
<i>A. hybridus</i>	Silv-39	39HYB
	Silv-43	43HYB
<i>A. retroflexus</i>	Silv-26	26RETR
	Silv-38	38RETR
<i>A. powellii</i>	Silv-49	49POW
	Silv-50	50POW
<i>A. palmeri</i>	Silv-27	27PALM
	Silv-35	35PALM
<i>A. spinosus</i>	Silv-47	47SPIN

Para la obtención del material vegetal, se sembraron semillas en 10 vasos de unicel por accesión, dejando crecer luego de tres a cinco plantas por vaso para la extracción del ADN. Se utilizaron plantas jóvenes, visiblemente libres de enfermedades y patógenos y poseedoras de las características propias de la especie (Figura 9).



Figura 9. Plantas de amaranto sembradas en vasos de unicel, utilizadas para la purificación del ADN.

Purificación de ADN

La purificación del ADN se hizo de acuerdo al protocolo de De la Cruz *et al.* (1997), con algunas modificaciones. Se tomaron hojas jóvenes (0.3 g) y se maceraron en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo muy fino. Este polvo se transfirió a un microtubo (Eppendorf) de 1.5 mL que contenía 600 μ L de amortiguador de extracción (20 mL Tris-HCL 1 M, pH 8.0; 20 mL EDTA 0.5 M, pH

8.0; 20 mL NaCl 5 M; 35 μ L β -Mercaptoetanol; 40 mL dodecil sulfato de sodio 20 %) y se incubó a 65 °C por 10 min con ayuda de un Standard Heatblock de VWR®Scientific Products, con inversión ocasional de los tubos.

Después, se adicionó 200 μ L de acetato de potasio 5M, se mezcló por inversión y se incubó por 30 min a 0 °C. Se centrifugó a 15000 x *g* durante 10 min a temperatura ambiente, y el sobrenadante se transfirió a otro tubo que contenía 700 μ L de isopropanol frío (-20 °C). Se mezcló por inversión e incubó a -20 °C por 30 min, después se centrifugó por 5 min a 10000 x *g* a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 200 μ L de solución para diluir (Tris-HCl 50 mM, EDTA-Na₂ 10 mM, pH 8.0), se agitó suavemente hasta diluir bien el precipitado.

Se añadió 2 μ L de ARNasa A y con ayuda de un horno Felisa® se incubó a 37 °C por 1 h. Después se adicionó 20 μ L de acetato de sodio 3M más 200 μ L de isopropanol, se mezcló por inversión y se dejó precipitar a -20 °C por 2 horas. Se centrifugó a 10000 x *g* por 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se eliminó y el precipitado se lavó con 300 μ L de etanol a 70 %. La pastilla se secó y se disolvió en amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na₂ 1 mM, pH 8.0) y por último se almacenó a 4 °C.

La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 UV Scanning® (Thermo Scientific). El ADN se utilizó en subsecuentes reacciones de PCR.

Reacción de PCR

Se ajustó la concentración de ADN de cada muestra a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, cantidad suficiente para la amplificación de patrones tipo ISSR. Se usaron 10 iniciadores (Cuadro 6). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 μL , que incluyó 3.2 μL de agua doble destilada estéril, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X (Tris-HCl 750 mM, pH 8.8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 2.0 μL de MgCl_2 (25 μM); 3.0 μL de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3 μL de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de $5\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; y 4.0 μL de ADN genómico a una concentración de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne®28 TC-512.

Cuadro 6. Iniciadores ISSR utilizados para el análisis de las poblaciones de amaranto.

Iniciador ISSR	Secuencia
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC- 3'
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA- 3'
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG- 3'
IAH-01	5'-ACACACACACACA- 3'
IAH-02	5'-GTGTGTGTGTGTGG- 3'
ISSR 01	5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG- 3'
ISSR 04	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'
(AG) 8YA	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA- 3'

Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, desnaturalización a 94 °C por un minuto, alineamiento a 50 °C por un minuto, Extensión a 72 °C por 2 min y una extensión final de 10 min a 72 °C, con un total de 30 ciclos (Figura 10).

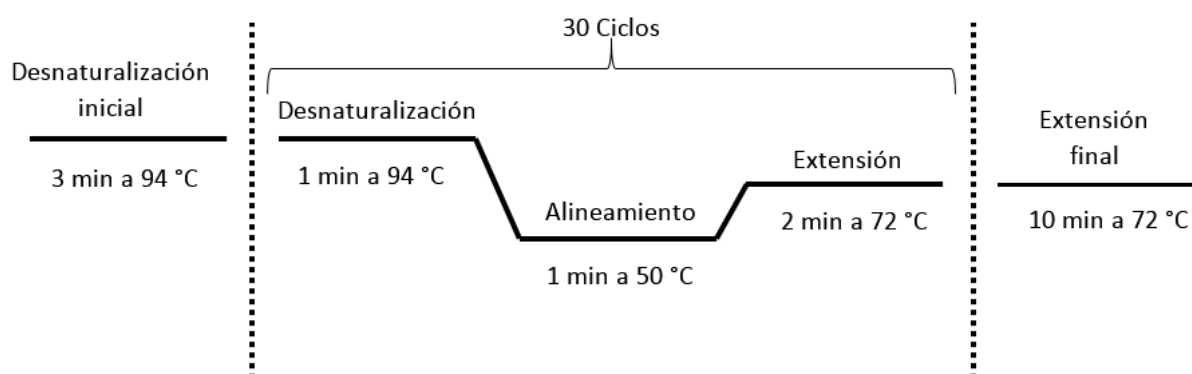


Figura 10. Esquema del programa de temperaturas utilizado para la obtención de los ISSR en el termociclador Techne®28TC-512.

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂ EDTA), por 1 h a 120 V. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 12 µL del producto de la reacción de PCR agregando 1 µL de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xilen cianol, 30 % de Ficoll y 1 % de SDS). Como referencia se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg.mL⁻¹) por 5 min y el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua 5 min y se documentaron

con ayuda del equipo Kodak® High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290, bajo luz UV.

Análisis de los datos

Los materiales se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo, asignando un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, asumiendo que bandas de igual peso molecular son idénticas entre especies, y se construyó una Matriz Básica de Datos (MBD).

Con el uso del programa POPGENE 32 (Yeh *et al.*, 1999), se estimaron los siguientes parámetros: porcentaje de *loci* polimórficos para las especies y las accesiones tomadas como población; diversidad genética de Nei, conocida como heterocigocidad esperada (H_e), la cual indica la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí (De Vicente *et al.*, 2004); índice de información de Shannon como medida de la diversidad genética; parámetro G_{st} (diferenciación entre poblaciones respecto a un locus) entre especies y entre poblaciones; Nm que es el número de “migrantes efectivos”; así como la matriz de distancias e identidades genéticas de Nei (1973) .

Además, con el software NTSYS-pc versión 2.2 (Rohlf, 2000) se visualizó el dendrograma generado en el programa POPGENE 32. Y por último, se cuantificó la variación presente entre las especies y poblaciones (accesiones), mediante un

AMOVA (Análisis Molecular de Variancia), con el programa GenAlEx 6.5 (Peakall y Smouse, 2006) con 999 permutaciones.

RESULTADOS

Se estudiaron 154 *loci* generados con diez iniciadores tipo ISSR para amplificar el ADN de cinco individuos de cada accesión. El promedio de bandas generadas por iniciador fue 15.4, con un rango de 6 a 21. El porcentaje de polimorfismo promedio para los iniciadores fue de 97.9 %, con un mínimo de 91.6 % y un máximo de 100 % (Cuadro 7).

Cuadro 7. Lista de iniciadores, su secuencia, número de productos amplificados y porcentaje de polimorfismo detectados.

Iniciador ISSR	Secuencia	Productos amplificados	Polimorfismo %
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC- 3'	17	100%
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'	21	100%
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGA- 3'	17	94.1%
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'	16	93.7%
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGTG- 3'	13	100%
IAH-01	5'-ACACACACACACA- 3'	16	100%
IAH-02	5'-GTGTGTGTGTGTGTGG- 3'	16	100%
ISSR 01	5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG- 3'	12	91.6%
ISSR 04	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'	6	100%
(AG) 8YA	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGAGYA- 3'	20	100%

Los iniciadores utilizados amplificaron un número adecuado de bandas polimórficas, de apariencia clara y nítida entre los individuos y especies de amaranto, como se muestra en la Figura 11A y 11B.

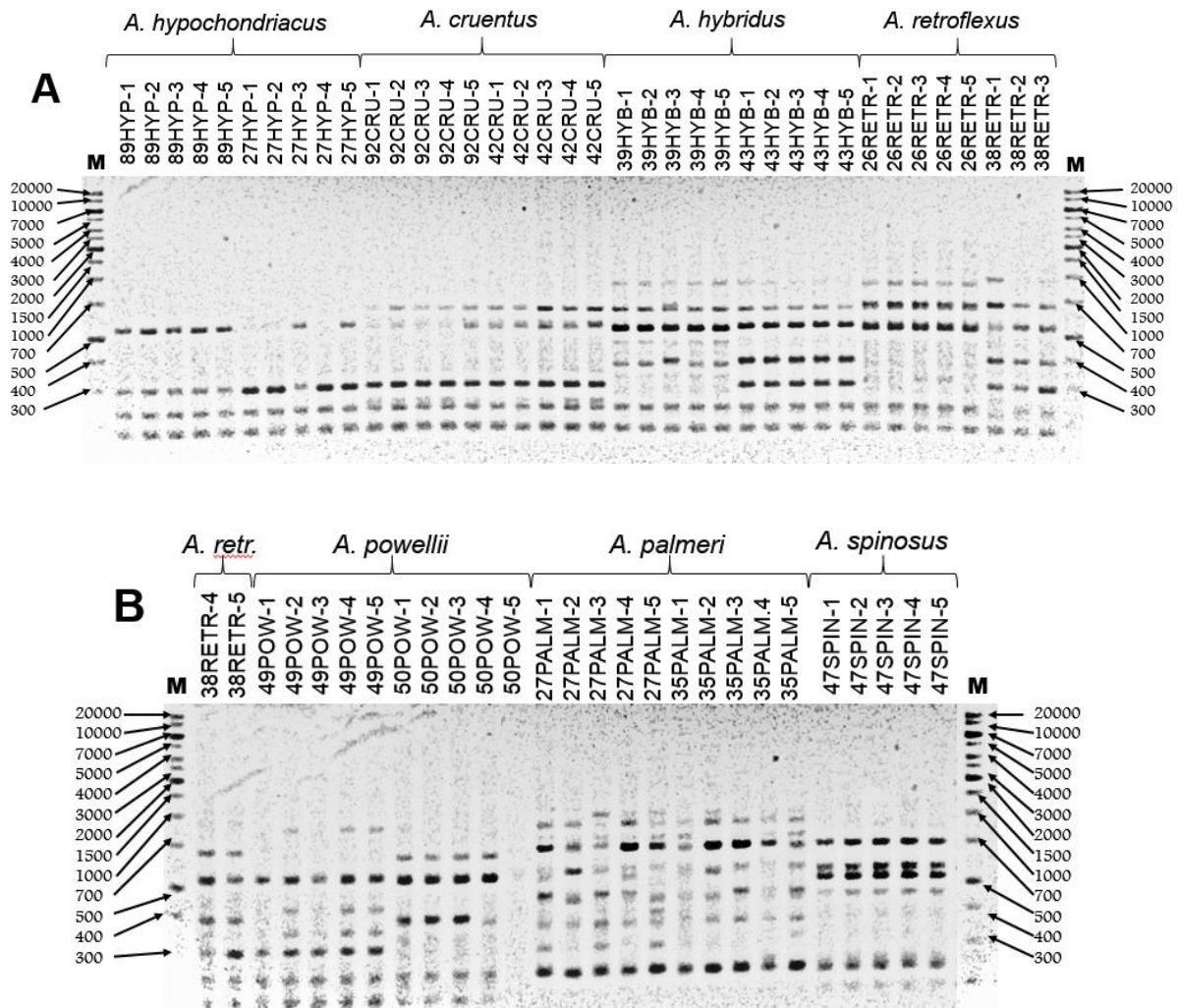


Figura 11. A. Patrones de bandas obtenidos con el iniciador P1 para una muestra de 5 individuos de las poblaciones de *A. hypochondriacus*, *A. cruentus*, *A. hybridus* y *A. retroflexus*. B. Patrones de bandeo obtenidos con el iniciador P1 para una muestra de 5 individuos de las poblaciones de *A. retroflexus*, *A. powellii*, *A. palmeri* y *A. spinosus*. M, marcador de peso molecular.

Diversidad genética y diferenciación de 13 poblaciones de amaranto

En la Figura 12 se muestra el dendrograma generado mediante el programa POPGENE 32 y graficado con NTSYS-pc versión 2.2; en el mismo se establecen relaciones genéticas entre trece poblaciones de amaranto correspondientes a siete especies y utilizando el coeficiente de identidad de Nei. A un coeficiente de identidad de 0.718 se observa la formación de dos grupos.

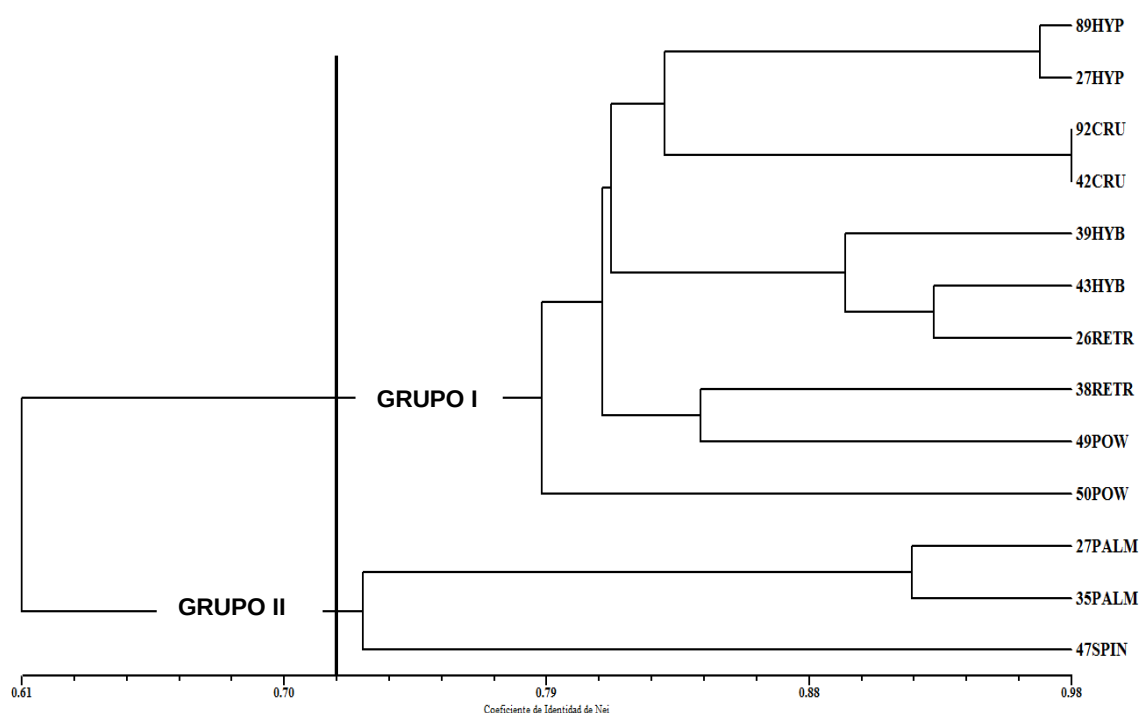


Figura 12. Dendrograma de relaciones genéticas entre poblaciones y especies de amaranto construido usando el coeficiente de identidad de Nei.

El grupo I se divide en cuatro subgrupos. El primer sub-grupo agrupa a las especies cultivadas *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, donde los materiales más idénticos son los que pertenecen a la especie de *A. cruentus* (92CRU, 42 CRU)

con un coeficiente de identidad igual a 0.9768, seguido de los materiales de *A. hypochondriacus* (89HYP, 27HYP) con un coeficiente de 0.9658, mientras los materiales más distantes dentro de este sub-grupo fueron *A. hypochondriacus* (89HYP) y *A. cruentus* (42CRU), el promedio de coeficiente de similitud entre estas especies fue de 0.8799, lo cual indica una alta similitud entre los materiales cultivados (Cuadro 8). El segundo sub-grupo se formó con accesiones de *A. hybridus* y *A. retroflexus*, los materiales más idénticos fueron *A. hybridus* (43HYB) y *A. retroflexus* (26RETR) con un coeficiente de 0.9285, mientras los materiales más alejados fueron 39HYB y 26RETR con un coeficiente de 0.8951, el promedio de coeficiente de identidad de este grupo es de 0.9078, lo cual indica un grupo bastante homogéneo. El tercer sub-grupo incluyó a materiales de *A. powellii* (49POW) y *A. retroflexus* (38RETR) con un coeficiente de 0.8467, mientras que el cuarto sub-grupo solo integró a un material de *A. powellii* (50POW) con un promedio de similitud de 0.8017 con respecto a los materiales silvestres de este grupo (*A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*).

El grupo II incluyó a amarantos dioicos de *A. palmeri* y el material monoico con presencia de espinas de *A. spinosus*, donde las accesiones más similares son las que pertenecen a *A. palmeri* (27PALM y 35PALM) con un coeficiente de identidad de 0.9207, mientras los más distantes fueron 27PALM de *A. palmeri* y 47SPIN de *A. spinosus* con un coeficiente de 0.7136, y el promedio de similitud dentro de este grupo fue de 0.7924 (Cuadro 8), con lo cual es posible deducir una reducida homogeneidad de este grupo.

Cuadro 8. Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genéticas (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para 13 poblaciones de amaranto.

Accesión		A. <i>hypochondriacus</i>		A. <i>cruentus</i>		A. <i>hybridus</i>		A. <i>retroflexus</i>		A. <i>powellii</i>		A. <i>palmeri</i>		A. <i>spinosus</i>	
		89HYP	27HYP	92CRU	42CRU	39HYB	43HYB	26RETR	38RETR	49POW	50POW	27PALM	35PALM	47SPIN	
hyp.	A	89HYP	****	0.9658	0.8353	0.7964	0.7725	0.8292	0.8169	0.8218	0.8078	0.7767	0.6606	0.6688	0.5876
		27HYP	0.0348	****	0.8737	0.8315	0.8010	0.8387	0.8330	0.8164	0.8185	0.7941	0.6516	0.6547	0.5788
cru.	A	92CRU	0.1800	0.1350	****	0.9768	0.8220	0.8230	0.8298	0.7986	0.8332	0.7825	0.6358	0.6496	0.5717
		42CRU	0.2277	0.1845	0.0235	****	0.8090	0.8103	0.8013	0.7966	0.8189	0.7596	0.6160	0.6211	0.5499
hyb.	A	39HYB	0.2582	0.2219	0.1960	0.2120	****	0.8999	0.8951	0.7980	0.7700	0.7905	0.5857	0.5996	0.5135
		43HYB	0.1873	0.1758	0.1948	0.2104	0.1055	****	0.9285	0.8485	0.7972	0.8145	0.5957	0.5906	0.5143
retr.	A	26RETR	0.2023	0.1828	0.1865	0.2215	0.1108	0.0742	****	0.8420	0.8051	0.8053	0.6039	0.6101	0.5538
		38RETR	0.1962	0.2028	0.2249	0.2275	0.2256	0.1642	0.1720	****	0.8467	0.7669	0.6274	0.6429	0.5753
pow.	A	49POW	0.2134	0.2003	0.1825	0.1998	0.2613	0.2266	0.2168	0.1665	****	0.8313	0.6506	0.6922	0.5923
		50POW	0.2527	0.2305	0.2453	0.2750	0.2351	0.2051	0.2166	0.2653	0.1848	****	0.6456	0.6452	0.5810
palm.	A	27PALM	0.4146	0.4283	0.4529	0.4845	0.5349	0.5181	0.5044	0.4662	0.4299	0.4376	****	0.9207	0.7136
		35PALM	0.4023	0.4236	0.4315	0.4763	0.5115	0.5266	0.4941	0.4418	0.3679	0.4383	0.0826	****	0.7431
spin.	A	47SPIN	0.5317	0.5468	0.5591	0.5980	0.6665	0.6650	0.5909	0.5529	0.5237	0.5430	0.3374	0.2969	****

Los resultados anteriores sugieren que los amarantos cultivados *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están muy relacionados entre sí y luego medianamente relacionados con los amarantos silvestres *A. hybridus*, *A. retroflexus* y *A. powellii*, en el orden indicado, y menos relacionadas con las especies *A. palmeri* y *A. spinosus*.

En lo referente a los amarantos silvestres se observa que las especies genéticamente más relacionadas son *A. hybridus*, *A. retroflexus*, *A. powellii*, y *A. palmeri* con *A. spinosus*. Las especies silvestres menos relacionadas fueron *A. palmeri* y *A. spinosus* con respecto a las demás especies silvestres.

En el Cuadro 9 se muestra que al considerar el porcentaje total de bandas amplificadas por los iniciadores, para la especie *A. hypochondriacus* (89HYP, 27HYP) el iniciador A8 fue el que amplificó el menor porcentaje de bandas con un valor de 9.5 % para ambas accesiones. Mientras que el iniciador que amplificó el mayor porcentaje de bandas fue ISSR4, con un valor de 66.6 % para la accesión 35PALM perteneciente a *A. palmeri*, seguido del iniciador A10 con 64.7 % para la accesión 27PALM también de *A. palmeri*. El iniciador IAH-01 amplificó 62.5 % de bandas para las accesiones 38RETR (*A. retroflexus*), 49POW (*A. powellii*) y 35PALM (*A. palmeri*), mientras que el iniciador P2 generó 62.5 % de bandas para la accesión 27PALM de *A. palmeri*.

Cuadro 9. Porcentaje y promedio de bandas generadas por iniciador por accesión.

Iniciador/accesión	AG8YA	ISSR3	A3	A8	A10	IAH-01	IAH-02	ISSR4	P2	P3	Promedio
NPA	20	12	17	21	17	16	16	6	16	13	15.40
89HYP	25.0%	16.6%	35.2%	9.5%	35.2%	37.5%	31.2%	16.6%	25.0%	30.7%	26.3%
27HYP	30.0%	41.6%	41.1%	9.5%	35.2%	37.5%	31.2%	16.6%	18.7%	30.7%	29.2%
92CRU	40.0%	58.3%	52.9%	28.5%	41.1%	31.2%	31.2%	50.0%	37.5%	30.7%	40.1%
42CRU	40.0%	58.3%	35.2%	28.5%	41.1%	37.5%	31.2%	50.0%	37.5%	23.0%	38.2%
39HYB	30.0%	58.3%	47.0%	23.8%	35.2%	37.5%	43.7%	33.3%	50.0%	23.0%	38.2%
43HYB	35.0%	50.0%	35.2%	28.5%	41.1%	31.2%	43.7%	16.6%	37.5%	23.0%	34.2%
26RETR	35.0%	33.3%	52.9%	23.8%	41.1%	37.5%	43.7%	16.6%	31.2%	23.0%	33.8%
38RETR	25.0%	25.0%	23.5%	19.0%	47.0%	62.5%	31.2%	33.3%	43.7%	15.3%	32.5%
49POW	40.0%	25.0%	29.4%	28.5%	47.0%	62.5%	37.5%	33.3%	43.7%	15.3%	36.2%
50POW	45.0%	33.3%	29.4%	38.1%	47.0%	37.5%	37.5%	33.3%	31.2%	30.7%	36.3%
27PALM	35.0%	41.6%	41.1%	42.8%	64.7%	56.2%	31.2%	33.3%	62.5%	38.4%	44.7%
35PALM	40.0%	50.0%	35.2%	38.1%	41.1%	62.5%	25.0%	66.6%	43.7%	23.0%	42.5%
47SPIN	55.0%	33.3%	47.0%	42.8%	29.4%	37.5%	31.2%	16.6%	31.2%	15.3%	33.9%
Promedio	36.54%	40.35%	38.85%	27.80%	42.02%	43.74%	34.58%	32.01%	37.95%	24.78%	

NPA: número de productos amplificados.

Se encontró que el porcentaje promedio de bandas por iniciador para todas las accesiones (Cuadro 9) se encontró que los que amplificaron bajo porcentaje de bandas fueron: P3 (24.78 %) y A8 (27.80 %). Los iniciadores con mayor porcentaje promedio de bandas fueron ISSR3 con 40.35 %, A10 con 42.02 % y IAH-01 con 43.74 %.

Finalmente, al considerar el porcentaje promedio de bandas amplificadas para todos los iniciadores por accesión, la especie que mostró el porcentaje de bandas amplificadas más bajo fue *A. hypochondriacus* para sus dos accesiones (26.3 % para 89HYP y 29.2 % para 27HYP). Mientras que el porcentaje de bandas amplificadas más alto lo mostraron *A. cruentus* 92CRU con 40.1 %, seguido de los materiales pertenecientes a *A. palmeri* 35PALM (42.5 %) y 27PALM (44.7 %).

En el Cuadro 10 se muestran los índices de diversidad calculados dentro de 13 poblaciones de amaranto. Se observa que todas las poblaciones tienen porcentajes de *loci* polimórficos muy bajos, con un promedio de 13.18 % y un rango que va de 3.25 % para la accesión 26RETR, perteneciente a la especie *A. retroflexus* a 30.52 % en la accesión 27PALM de la especie *A. powellii* (Cuadro 10). De lo anterior se puede inferir que la variabilidad genética de las poblaciones de amaranto estudiadas en este trabajo es bastante baja.

Los índices de Shannon (I) y diversidad genética de Nei (H) fueron bajos para todas las poblaciones. Los índices de Shannon tuvieron un promedio de 0.0770, con rango de 0.0168 para la accesión 26RETR de *A. retroflexus* y 0.1808 para la accesión 27PALM de *A. palmeri*, mientras que el índice de diversidad de Nei (H)

mostró un promedio de 0.05366, con un rango de 0.0111 para la accesión 26RETR de *A. retroflexus* y de 0.1245 para la accesión 27PALM de *A. palmeri*.

Para el número de alelos por locus (NA) y el número efectivo de alelos por locus (NE) el rango de valores entre las poblaciones estuvo entre 1.0325 a 1.3052 y 1.0192 a 1.2253, respectivamente.

Cuadro 10. Índices de diversidad genética dentro de 13 poblaciones del género *Amaranthus*.

Especie	Accesión		NA	NE	H	I	NLP	% LP
<i>A. hypochondriacus</i>	89HYP	$\bar{x}$	1.1039	1.0930	0.0487	0.0687	16	10.39
		σ	0.3061	0.2780	0.1443	0.2029		
	27HYP	$\bar{x}$	1.1364	1.0997	0.0549	0.0799	21	13.64
		σ	0.3443	0.2737	0.1453	0.2076		
<i>A. cruentus</i>	92CRU	$\bar{x}$	1.1234	1.1144	0.0586	0.0822	19	12.34
		σ	0.3299	0.3116	0.1586	0.2214		
	42CRU	$\bar{x}$	1.0649	1.0510	0.0274	0.0393	10	6.49
		σ	0.2472	0.2070	0.1084	0.1536		
<i>A. hybridus</i>	39HYB	$\bar{x}$	1.0455	1.0334	0.0181	0.0263	7	4.55
		σ	0.2090	0.1680	0.0881	0.1253		
	43HYB	$\bar{x}$	1.0584	1.0446	0.0240	0.0346	9	5.84
		σ	0.2353	0.1952	0.1013	0.1438		
<i>A. retroflexus</i>	26RETR	$\bar{x}$	1.0325	1.0192	0.0111	0.0168	5	3.25
		σ	0.1778	0.1213	0.0658	0.0961		
	38RETR	$\bar{x}$	1.1623	1.0964	0.0584	0.0877	25	16.23
		σ	0.3700	0.2385	0.1382	0.2046		

Cuadro 10. (Continuación...)

Especie	Accesión		NA	NE	H	I	NLP	% LP
<i>A. powellii</i>	49POW	$\bar{x}$	1.1104	1.0811	0.0451	0.0656	17	11.04
		σ	0.3144	0.2464	0.1328	0.1906		
	50POW	$\bar{x}$	1.1948	1.1573	0.0850	0.1216	30	19.48
		σ	0.3973	0.3358	0.1774	0.2517		
<i>A. palmeri</i>	27PALM	$\bar{x}$	1.3052	1.2253	0.1245	0.1808	47	30.52
		σ	0.4620	0.3727	0.1977	0.2819		
	35PALM	$\bar{x}$	1.2987	1.2014	0.1132	0.1667	46	29.87
		σ	0.4592	0.3536	0.1877	0.2686		
<i>A. spinosus</i>	47SPIN	$\bar{x}$	1.0779	1.0511	0.0287	0.0425	12	7.79
		σ	0.2689	0.2001	0.1062	0.1530		

NA: número de alelos por locus; **NE:** número efectivo de alelos por locus; **H:** diversidad genética de Nei's; **I:** índice de Shannon; **NLP:** número de *loci* polimórficos; **% LP:** porcentaje de *loci* polimórficos.

El análisis de diversidad genética entre las trece poblaciones mostró que el porcentaje de *loci* polimórficos (% LP) fue de 99.35 % (Cuadro 11). El coeficiente de diferenciación genética entre las poblaciones fue alto ($G_{st} = 0.8165$), e indica que aproximadamente 82 % de la variación detectada puede atribuirse a diferencias genéticas entre las poblaciones. El resto (18%) representa diversidad genética dentro de las poblaciones. Con base al coeficiente de diferenciación genética total entre las poblaciones (G_{st}) el nivel de flujo génico estimado (N_m) fue de 0.1123 (Cuadro 11). Esto indica que hay menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones, lo que también explica el alto nivel de diferenciación detectado entre las poblaciones.

Cuadro 11. Análisis de diversidad genética de Nei entre 13 poblaciones del género *Amaranthus*.

Entre poblaciones	Ht	Hs	G _{ST}	Nm	NLP	%LP
$\bar{x}$	0.2873	0.0527	0.8165	0.1123	153	99.35
σ	0.0214	0.0021				

Ht: diversidad genética total; **Hs:** diversidad genética intra poblacional; **G_{ST}:** coeficiente de diversidad genética entre poblaciones; **Nm:** número de individuos migrantes por generación; **NLP:** número de *loci* polimórficos; **% LP:** porcentaje de *loci* polimórficos.

Diversidad genética y diferenciación de 7 especies de amaranto

El dendrograma obtenido mediante el análisis de poblaciones (Figura 13) generado por el programa POPGENE 32 y graficado con NTSYS-pc versión 2.2, facilitó la interpretación de los datos por especie, donde se observa que las especies genéticamente más cercanas fueron las silvestres *A. hybridus* y *A. retroflexus* con un coeficiente de 0.93, siguiéndoles *A. powellii* con un coeficiente de 0.874.

Las especies cultivadas estuvieron genéticamente cercanas entre sí, aunque relacionadas con las especies silvestres mencionadas. *A. hypochondriacus* se relaciona con *A. cruentus* con un coeficiente de identidad genética de Nei igual a 0.858. Las especies silvestres *A. palmeri* y *A. spinosus*, relacionadas entre sí, estuvieron muy alejadas de los amarantos cultivados *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, así como de los amarantos silvestres *A. hybridus*, *A. retroflexus* y *A. powellii*.

En cuanto a los índices de diversidad genética calculados dentro de especies, en el Cuadro 12 se observa que el porcentaje de *loci* polimórficos es bastante bajo para la siete especies evaluadas, con un promedio de 24.02 % y un rango de valores que va de 7.79 % para *A. spinosus* y de 44.16 % para *A. palmeri*.

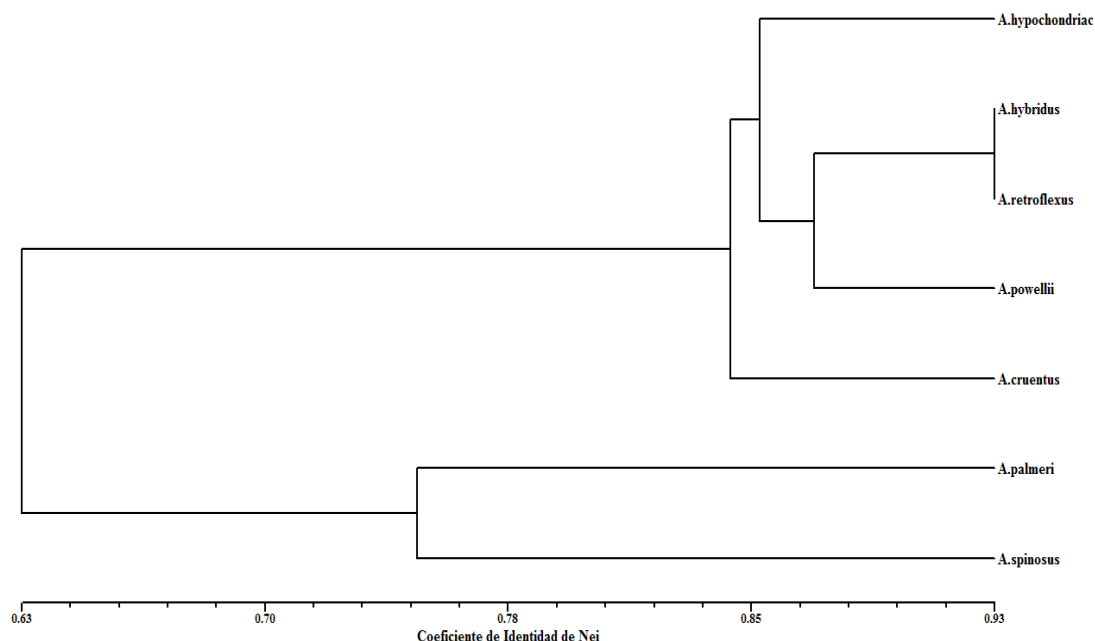


Figura 13. Dendrograma de relaciones genéticas entre 7 especies de amaranto construido con el coeficiente de identidad de Nei.

Los índices de Shannon (I) y de diversidad genética de Nei (H) también mostraron bajos niveles (Cuadro 12), los índices de Shannon mostraron un promedio de 0.1319, con un rango de valores que va de 0.0425 para la especie *A. spinosus* y de 0.2348 para la especie *A. palmeri*, mientras que el índice de diversidad de Nei (H) mostró un promedio de 0.0890, con un rango de 0.0287 y 0.1574.

Para el número de alelos por locus (NA) y el número efectivo de alelos por locus (NE) el rango de valores para las especies evaluadas estuvo entre 1.0779 a 1.4416 y 1.0511 a 1.1.2699, respectivamente.

Cuadro 12. Índices de diversidad genética dentro de siete especies del género *Amaranthus*.

Especie		NA	NE	H	I	NLP	% LP
<i>A. hypochondriacus</i>	$\bar{x}$	1.1948	1.1254	0.0710	0.1049	30	19.48
	σ	0.3973	0.2916	0.1579	0.2271		
<i>A. cruentus</i>	$\bar{x}$	1.1429	1.1020	0.0575	0.0837	22	14.29
	σ	0.3511	0.2671	0.1464	0.2108		
<i>A. hybridus</i>	$\bar{x}$	1.1623	1.1139	0.0656	0.0959	25	16.23
	σ	0.3700	0.2695	0.1529	0.2218		
<i>A. retroflexus</i>	$\bar{x}$	1.2922	1.1732	0.1023	0.1534	45	29.22
	σ	0.4563	0.3107	0.1738	0.2531		
<i>A. powellii</i>	$\bar{x}$	1.3701	1.2404	0.1409	0.2085	57	37.01
	σ	0.4844	0.3433	0.1937	0.2817		
<i>A. palmeri</i>	$\bar{x}$	1.4416	1.2699	0.1574	0.2348	68	44.16
	σ	0.4982	0.3607	0.1972	0.2842		
<i>A. spinosus</i>	$\bar{x}$	1.0779	1.0511	0.0287	0.0425	12	7.79
	σ	0.2689	0.2001	0.1062	0.1530		

NA: número de alelos por locus; **NE:** número efectivo de alelos por locus; **H:** diversidad genética de Nei; **I:** índice de Shannon; **NLP:** número de *loci* polimórficos; **% LP:** porcentaje de *loci* polimórficos.

El análisis de la diversidad genética entre las especies indicó un porcentaje de *loci* polimórficos (% LP) igual a 99.35 % (Cuadro 13). El coeficiente de diferenciación

genética entre las especies fue alto ($G_{st} = 0.6999$), e indica que aproximadamente 69 % de la variación genética detectada puede atribuirse a diferencias genéticas entre las especies. El resto (31 %) representa diversidad genética dentro de las especies. Con base al coeficiente de diferenciación genética total entre las especies (G_{st}), el nivel de flujo génico estimado (N_m) fue de 0.2144 (Cuadro 13). Esto indica que hay menos de un individuo migrante por generación entre las especies, lo que también explica el alto nivel de diferenciación detectado entre las mismas.

Cuadro 13. Análisis de diversidad genética de Nei entre especies del género *Amaranthus*.

Entre especies	Ht	Hs	G_{st}	N_m	NLP	%LP
$\bar{x}$	0.2935	0.0881	0.6999	0.2144	153	99.35
σ	0.0231	0.0049				

Ht: diversidad genética total; **Hs:** diversidad genética intra poblacional; **G_{st} :** coeficiente de diversidad genética entre poblaciones; **N_m :** número de individuos migrantes por generación; **NLP:** número de *loci* polimórficos; **% LP:** porcentaje de *loci* polimórficos.

El Cuadro 14 muestra los valores de identidad y distancia genética entre las siete especies de amaranto evaluadas. Se observa que las especies genéticamente más cercanas fueron *A. hybridus* y *A. retroflexus* con un valor de identidad de 0.9272, mientras que las especies más alejadas fueron *A. spinosus* y *A. hybridus* con un valor de 0.5344.

Cuadro 14. Medidas de Identidad genética y distancia genética de Nei para siete especies de amaranto.

Especie	A. <i>hypochondriacus</i>	A. <i>cruentus</i>	A. <i>hybridus</i>	A. <i>retroflexus</i>	A. <i>powellii</i>	A. <i>palmeri</i>	A. <i>spinosus</i>
<i>A. hypochondriacus</i>	****	0.8491	0.8415	0.8706	0.8529	0.6934	0.5907
<i>A. cruentus</i>	0.1636	****	0.8399	0.8549	0.8403	0.6621	0.5678
<i>A. hybridus</i>	0.1726	0.1745	****	0.9272	0.8575	0.6375	0.5344
<i>A. retroflexus</i>	0.1386	0.1567	0.0756	****	0.8860	0.6706	0.5868
<i>A. powellii</i>	0.1592	0.1740	0.1537	0.1210	****	0.7160	0.6198
<i>A. palmeri</i>	0.3661	0.4123	0.4501	0.3996	0.3341	****	0.7496
<i>A. spinosus</i>	0.5265	0.5659	0.6266	0.5330	0.4783	0.2882	****

Valores de identidad genética (por arriba de la diagonal) y distancia genética (por debajo de la diagonal) de Nei (1972) para 7 especies de amaranto.

Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

Para los análisis de varianza molecular (AMOVA) se establecieron las hipótesis H0 y H1 con valores de $\Phi_{IPT} = 0$ y $\Phi_{IPT} > 0$, respectivamente, como se muestra a continuación:

H0 = No hay diferencias genéticas entre las poblaciones ($\Phi_{IPT} = 0$).

H1 = Si hay diferencias genéticas entre las poblaciones ($\Phi_{IPT} > 0$).

Con base en lo anterior, los resultados del AMOVA y considerando los valores de Φ_{IPT} (Cuadro 15) para todas las fuentes de variación, se observa la existencia de diferencias genéticas significativas ($p \leq 0.001$) entre las poblaciones estudiadas.

Entre las poblaciones se detectó un valor de variabilidad genética igual al 79 %, mientras que el 21 % restante se encuentra dentro de las poblaciones.

Al considerar especies se encontró que entre las mismas se presenta 68 % de la variación genética total y solo el 32 % está dentro de las especies.

Al comparar los materiales cultivados contra los silvestres se encontró que la variación genética presente dentro de ambos tipos de materiales es muy baja con un valor de 21 %, mientras que la variación entre los mismos fue muy alta (79 %), esto indica la existencia de variación genética susceptible de utilizar en programas de mejoramiento de los amarantos cultivados.

También, se encontró que la variación genética entre las poblaciones de amaranto cultivados fue de 72 % y el 28 % se encuentra dentro de las mismas, con lo cual también se demuestra la alta diferenciación presente entre *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*.

Cuando se compararon solo los materiales silvestres se tuvo que 66 % de la variación genética se encuentra entre las poblaciones y solo el 34 % dentro de estas. Y por último al hacer la comparación entre los materiales silvestres dioicos contra los monoicos, los resultados indicaron que la variación genética presente entre las poblaciones es del 46 % y el resto (54 %) está dentro de las poblaciones.

Cuadro 15. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA) de accesiones de amaranto.

Fuente de Variación	Análisis	df	SS	MS	Var. Est.	%	PhiP _T	Valor x
Entre accesiones	Entre	12	1177.385	98.115	18.645	79%	0.792	***
	Dentro	52	254.400	4.892	4.892	21%		

Cuadro 15. (Continuación...)

Fuente de Variación	Análisis	df	SS	MS	Var. Est.	%	PhiP _T	Valor x
Entre especies	Entre	6	970.485	161.747	16.661	68%	0.677	***
	Dentro	58	461.3	7.953	7.953	32%		
Cultivadas vs silvestres	Entre	1	171.212	171.212	5.460	21%	0.214	***
	Dentro	63	1260.572	20.009	20.009	79%		
Entre cultivadas	Entre	1	119.850	119.850	11.531	72%	0.718	***
	Dentro	18	81.700	4.539	4.539	28%		
Entre silvestres	Entre	4	679.422	169.856	18.041	66%	0.655	***
	Dentro	40	379.600	9.490	9.490	34%		
Entre Dioicos vs Monoicos	Entre	1	284.948	284.948	15.762	46 %	0.464	***
	Dentro	63	1146.836	18.204	18.204	54 %		

df: grados de libertad; SS: suma de cuadrados; MS: suma de cuadrados medios; x = Probabilidad, NS= no significativo, * = 0.05, **= 0.01, ***= 0.001

DISCUSIÓN

Los resultados de los análisis de agrupamiento del presente trabajo coinciden con los de Popa (2010), quien encuentra que las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están más relacionadas, mostrando una distancia genética de entre el 18 al 20 %, mientras *A. powellii* se encuentra muy distante de las mismas. También, Legaria (2010) encontró que las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están bastante relacionadas.

Por otro lado Ranade *et al.* (1997), Ray y Roy (2008), Maughan *et al.* (2011), mencionan la agrupación de los materiales cultivados y la diferenciación de estos con otros materiales. Estos autores coinciden con el origen monofilético de los materiales cultivados, esta teoría también es mencionada por Chan y Sun (1997),

los cuales mencionan que los materiales de grano tienen un solo progenitor putativo. Ranade *et al.* (1997) reportan la agrupación distante que hace *A. spinosus* de *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*. Mientras que Pal y Khoshoo (1972), reportan asociación entre las amarantos cultivados y sus posibles progenitores *A. hybridus* L. y *A. powellii*, resultados que son parecidos a los obtenidos en el presente trabajo.

Los porcentajes más altos de polimorfismo fueron encontrados en los materiales silvestres de *A. powellii* (37.01 %), *A. palmeri* (44.16 %) y *A. retroflexus* (29.22 %) debido a que posiblemente dichos materiales se ven menos expuestos a una presión de selección ya sea por factores del ambiente bióticos o abióticos o por el hombre mediante mejoramiento genético, tal como lo mencionan Chan y Sun (1997).

El índice de diversidad genética de Nei (H) tuvo un promedio de 0.0890 dentro de las poblaciones, con un rango de 0.0287 a 0.1574, datos que coinciden con lo reportado por Legaria (2010) con lo cual se puede predecir la baja variabilidad genética en las especies y las poblaciones.

La variabilidad genética dentro de las diferentes poblaciones de amaranto estudiadas en este trabajo, como se mencionó antes es bastante baja, estos estudios coinciden con lo reportado por Legaria (2010) en su trabajo de diversidad genética de amaranto. Esta baja variabilidad genética que existe dentro de las diferentes poblaciones y especies de amaranto se puede explicar por el alto porcentaje de autopolinización que ocurre en la planta. Al respecto, Popa *et al.* (2010) mencionan que el bajo nivel de polimorfismo en *Amaranthus* puede reflejar

el alto nivel de endogamia que existe en la especie. Kulakow y Hauptli (1994), mencionan que el genotipo y el ambiente influyen en la tasa de polinización cruzada (6 a 34%) de manera cuantitativa y cualitativa.

Se han realizado trabajos de hibridación interespecíficos tanto en materiales silvestres como materiales cultivados. Murray (1940), al hacer cruzamientos en *Amaranthus*, menciona la dificultad para la obtención de híbridos debido a la baja tasa de sobrevivencia de los mismos. Franssen *et al.* (2001) reportan 0.1 % de hibridación entre *A. tuberculatus* y *A. palmeri*. Trucco *et al.* (2005) obtuvieron solo 5.9 % de hibridación entre *A. hybridus* y *A. tuberculatus*, mientras que Gaines *et al.* (2012) al hacer cruzamientos entre *A. palmeri* y *A. spinosus* obtuvieron menos del 0.01 % a 0.4 % de hibridación, entre *A. palmeri* y *A. tuberculatus* obtuvieron el 0.2 % de hibridación y entre *A. palmeri* y *A. hybridus* menos del 0.01 % de hibridación.

Para especies cultivadas Jain *et al.* (1982) mencionan el cruzamiento entre *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus* y reportan que existe mucha variación en cuanto a los porcentajes de cruzamiento obtenidos, del 5 a 30 %. Al respecto, Agong y Ayiecho (1991) estiman entre 10.4 % a 10.9 % de hibridación entre *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*. Con este bajo porcentaje de entrecruzamientos es posible deducir la alta tasa de diferenciación entre las diferentes especies y la baja variabilidad genética presente dentro de las poblaciones, porque el flujo génico entre las especies se ve muy limitado.

El coeficiente de diferenciación genética (G_{st}) entre las poblaciones fue de 0.8165 y entre las especies de 0.6999. Estos valores son altos y coinciden con lo

reportado por Chan y Sun (2007) para los amarantos de grano cultivados (*A. caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*), quienes indican un valor medio de G_{st} igual a 0.977 a nivel de especies y en particular para *A. hybridus*, *A. powellii*, y *A. quitensis* de 0.963.

El número de individuos migrantes (N_m) que da una idea del grado de flujo génico fue de 0.1123 entre las poblaciones y de 0.2144 entre las especies, valores que coinciden con lo reportado por Legaria (2010). Dichos valores indican que en promedio existe menos de un individuo migrante por generación entre las poblaciones y entre las especies, con lo cual se confirma el bajo porcentaje de cruzamiento y el alto grado de diferenciación entre las poblaciones y las especies.

CONCLUSIONES

Los amarantos de grano cultivados mostraron estar genéticamente muy relacionados entre sí y con sus posibles progenitores silvestres (*A. hybridus* y *A. powellii*). Dentro de los materiales silvestres los que estuvieron más cercanos fueron *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*, mientras que *A. spinosus* y *A. palmeri* fueron los más alejados. La mayor parte de la diversidad genética detectable se encontró entre las especies y las accesiones, mientras que la menor parte estuvo dentro de las mismas. Los marcadores moleculares tipo ISSR fueron útiles para caracterizar accesiones y estimar la diversidad genética en poblaciones de *Amaranthus*.

BIBLIOGRAFÍA

- Agong, S. G. and Ayiecho, P. O. 1991. The rate of outcrossing in grain amaranths. *Plant Breeding* 107:156–160.
- Chan, K. F. and Sun, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 95:865-873.
- De la Cruz, M.; Ramírez, F. and Hernández, H. 1997. DNA isolation and amplification from cacti. *Plant Molecular Biology Reporter* 15:319-325.
- De Vicente, M. C.; López, C. and Fulton, T. 2004. Genetic diversity analysis with molecular marker data. Vol. 2. Learning module. CD-ROM. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, Universidad Nacional Agraria 'La molina', Peru, y Institute for Genomic Diversity, Cornell University, Ithaca, NY, USA.
http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/user_upload/online_library/publications/pdfs/Molecular_Markers_Volume_2_en.pdf. Consultado el 15 de noviembre de 2014.
- Espinosa O., D. y Ocegueda C., S. 2008. El conocimiento biogeográfico de las especies y su regionalización natural, *In*: Capital natural de México, vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente B., J. (eds.). CONABIO. México. pp: 33-65.
- Espitia R., E.; Mapes S., C.; Escobedo L., D.; De la O O., M.; Rivas V., P.; Martínez T., G.; Cortés E., L. y Hernández C., J. M. 2010. Conservación y

- uso de los recursos genéticos de Amaranto en México. INIFAP, Centro de Investigación Regional Centro, Celaya, Guanajuato, México. 200 p.
- Franssen, A. S.; Skinner, D. Z.; Al-Khatib, K.; Horak, M. J. and Kulakow, P. A. 2001. Interspecific hybridization and gene flow of ALS resistance in *Amaranthus* species. *Weed Science* 49(5):598-606.
- Gaines, T. A.; Ward, S. M.; Bukun, B.; Preston, C.; Leach, J. E. and Westra, P. 2012. Interspecific transfer of glyphosate resistance. *Evolutionary Applications* 5(1):29–38.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos*. Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). Boletín técnico no. 8, Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. pp: 2-26.
- Huerta O., J. A.; Briones C., E. P.; Mendoza H., G.; De León R., A. and Barba de la R., A. P. 2009. Proteomic analysis of amaranth (*Amaranthus hypochondriacus* L.) leaves under drought stress. *International Journal of Plant Science* 170:990-998.
- Hunziker, A. T. 1991. Sinopsis de las especies silvestres de *Amaranthus* del continente americano, con especial referencia a las monoicas. Primer Congreso Internacional del Amaranto. Oaxtepec, Morelos. México. 22 p.

- Jacobsen, S. E. y Shewood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Quito, Ecuador, FAO-Centro Internacional de la Papa-Catholic Relief Service. 14 p.
- Jain, S. K.; Hauptli, H. and Vaidya, K. R. 1982. Outcrossing rate in grain amaranths. *Journal Heredity* 73:71-72.
- Kulakow, P. A. and Hauptli, H. 1994. Genetic characterization of grain amaranth. *In: Amaranth*. Lozoya G., E. (ed.). CRC Press Inc. pp: 9-22.
- Legaria S., J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus spp.*). *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(2):89-95.
- Mapes, C. 2001. Asignación de biomasa en tres colectas de amaranto (*Amaranthus spp.*) con diferente grado de manejo. *In: Plantas, Cultura y Sociedad. Estudio sobre la relación entre seres humanos y plantas en los albores del siglo XXI*. Rendón, A. B.; Rebollar, D. S.; Caballero, N. J. y Martínez A., M. A. (eds.). Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa, México. 317 p.
- Maughan, P. J.; Smith, S. M.; Fairbanks, D. J. and Jellen, E. N. 2011. Development, Characterization, and Linkage Mapping of Single Nucleotide Polymorphisms in the Grain Amaranths (*Amaranthus sp.*). *The Plant Genome* 4:92–101.
- Murray, M. J. 1940. The genetics of sex determination in the family *Amaranthaceae*. *Genetics* 25:409–431.

- Nei, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Sciences USA 70:3321-3323.
- Omamt, E. N.; Hammes, P. S. and Robbertse, P. J. 2006. Differences in salinity tolerance for growth and water use efficiency in some amaranth (*Amaranthus* spp.) genotypes. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science 34:11-22.
- Pal, M. and Khoshoo, T. N. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. Journal of Heredity 63:78-82.
- Peakall, R. and Smouse, P. E. 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6:288-295.
- Piñero, D. 2008. La diversidad genética como instrumento para la conservación y el aprovechamiento de la biodiversidad: estudios en especies mexicanas. *In*: Capital natural de México. Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente B., J. (eds.). CONABIO, México. pp: 437-494.
- Piñero, D. 2008a. La variabilidad genética de las especies: aspectos conceptuales y sus aplicaciones y perspectivas en México. *In*: Capital natural de México, Vol. I: Conocimiento actual de la biodiversidad. Soberón, J.; Halffter, G. y Llorente B., J. (eds.). CONABIO, México. pp: 415-435.

- Popa, G.; Cornea, C. P.; Ciuca, M.; Babeanu, N.; Popa, O. and Marin, D. 2010. Studies On Genetic Diversity In *Amaranthus* Species Using The RAPD Markers. *Analele Universităţii din Oradea-Fascicula Biologie* 17(2):280-285.
- Ranade, S. A.; Kumar, A.; Goswami, M.; Farooqui, N. and Sane, P. V. 1997. Genome analysis of amaranths: Determination of inter and intra species variations. *Journal of Biosciences* 22(4):457-464.
- Ray, T. and Roy, S. C. 2008. Genetic Diversity of *Amaranthus* Species from the Indo-Gangetic Plains Revealed by RAPD Analysis Leading to the Development of Ecotype-Specific SCAR Marker. *Oxford Journals* 100(3):338-347.
- Robertson, K. R. 1981. The General of *Amarantaceae* in the south eastern United States. *Journal of the Arnold Arboretum* 62(3):267-314.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.1. User Guide. Department of Ecology and Evolution. State University of New York, Stony Brook, NY. 38 p.
- Sosa, V. and De-Nova, J. A. 2012. Endemic angiosperm lineages in Mexico: hotspots for conservation. *Acta Botánica Mexicana* 100:293-315.
- Trucco, F.; Jeschke, M. R.; Rayburn, A. L. and Tranel, P. J. 2005. *Amaranthus hybridus* can be pollinated frequently by *A. tuberculatus* under field conditions. *Heredity* 94:64–70.
- Yeh, F. C.; Yang, R. and Boyle, T. 1999. POPGENE v1.31. University of Alberta and Centre for International Forestry Research. Canada.

III. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA DE ACCESIONES DE AMARANTO

RESUMEN

La caracterización, conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad, además de que la caracterización morfológica es una herramienta poderosa e importante para identificar caracteres de importancia agronómica para el desarrollo de cultivares mejorados. El objetivo de esta investigación fue conocer la variabilidad morfológica presente en 25 accesiones de amaranto provenientes del Programa de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a través de la caracterización morfológica. Se evaluaron diez individuos por accesión, mismos a los que se les tomó un conjunto de datos en las diferentes etapas de desarrollo. Los descriptores utilizados fueron los propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) e International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). Los caracteres que más contribuyeron al total de la variabilidad detectada en *Amaranthus* fueron los correspondientes a las características de la hoja (largo y ancho), el peso de 500 semillas, la época de aparición de la inflorescencia, época de floración, época de maduración, la longitud de la inflorescencia y la altura de la planta. Las características más correlacionadas fueron el largo y el ancho de las hojas. Se detectó relación alta entre los materiales cultivados y los materiales silvestres (*A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*) lo cual apoya la teoría de posibles progenitores de los materiales cultivados.

INTRODUCCIÓN

El género *Amaranthus* se distribuye ampliamente en México, teniendo representantes en todos los estados del país. Aunque la mayor concentración de especímenes se localiza en la zona biogeográfica denominada Eje Volcánico Transmexicano (Morrone, 2005; citado por Espitia *et al.*, 2010), el género está presente en toda la República Mexicana, desde las planicies costeras hasta las zonas montañosas. Las especies cultivadas *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* se distribuyen en la parte centro-sur de México; la especie silvestre *A. hybridus* se localiza prácticamente en todo México, mientras que *A. powellii* está ubicada en la región centro-norte de México (Espitia *et al.*, 2010).

La caracterización, conservación y utilización de los recursos genéticos es de importancia estratégica para la humanidad. Ello debido a que en los últimos años la diversidad genética se ha visto reducida por factores múltiples como las exigencias del mercado, el desplazamiento de las variedades criollas por cultivares foráneos, abuso de sustancias químicas, destrucción de ecosistemas y la erosión genética, entre otros (Jaramillo y Baena, 2000).

La caracterización de las especies y poblaciones ya sean locales o introducidas es una herramienta poderosa e importante para identificar caracteres de importancia agronómica para el desarrollo de cultivares mejorados (Kauffman y Reider, 1986).

La diversidad genética dentro y entre especies puede determinarse mediante la caracterización morfológica, que permite obtener información sobre la identidad de cada una de las accesiones evaluadas mediante el uso de descriptores. Éstos nos ayudan a estudiar la variabilidad genética de cada muestra y constituyen una

herramienta importante para evitar duplicaciones de un material y minimizar la sobrestimación de la diversidad existente (Becerra y Paredes, 2000).

Considerando lo anterior, el objetivo de esta investigación fue conocer la variabilidad morfológica presente en 25 accesiones de amaranto previamente identificadas, provenientes del Programa de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) a través de la caracterización morfológica.

MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en un invernadero rústico del Posgrado de Horticultura, perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo durante los meses de Febrero a Octubre del 2014. La Universidad se localiza en el Estado de México, entre las coordenadas 19° 29' 34.61" LN, 98° 53' 06.93" LO a 2254 msnm. La zona presenta un clima templado subhúmedo. La temperatura media oscila entre 22 y 28 °C. El clima se clasifica como C W₀ wb (y) g (García, 1988).

El material vegetal se constituyó de 25 accesiones de amaranto previamente identificadas (Cuadro 16), provenientes del Programa de Recursos Genéticos del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, municipio de Texcoco, México.

Cuadro 16. Lista de accesiones utilizadas en la caracterización morfológica.

Especie	Accesión	Abreviación
<i>A. hypochondriacus</i>	Tlax-089	THYP
	Revancha	RHYP
	Nutrisol	NHYP
	Pue-027	PHYP
<i>A. cruentus</i>	Gto-078	78CRU
	Gto-092	92CRU
	Mor-041	41CRU
	Mor-042	42CRU
<i>A. hybridus</i>	Silv-28	28HYB
	Silv-39	39HYB
	Silv-43	43HYB
	Silv-44	44HYB
<i>A. retroflexus</i>	Silv-40	40RETR
	Silv-26	26RETR
	Silv-34	34RETR
	Silv-38	38RETR
<i>A. powellii</i>	Silv-46	46POW
	Silv-48	48POW
	Silv-49	49POW
	Silv-50	50POW
<i>A. palmeri</i>	Silv-27	27PALM
	Silv-33	33PALM
	Silv-35	35PALM
	Silv-36	36PALM
<i>A. spinosus</i>	Silv-47	47SPIN

El 8 de febrero de 2014 se sembraron alrededor de 20 semillas por accesión en charolas de poliestireno tipo forestal con 60 cavidades redondas de 250 x 600 x 120 mm, rellenas con el sustrato 'peat moss'. Las plantas germinadas (Figura 14a) se fertilizaron con ULTRASOL 15 – 30 – 15 + ME.



Figura 14. a) Emergencia de plántulas de amaranto; b) plantas de amaranto listas para trasplantar; c) disposición de las plantas de amaranto en el invernadero; d) desarrollo de las plantas adultas de amaranto.

Se hizo un aclareo de las plántulas germinadas, dejando las visiblemente sanas y con las características propias de cada accesión. Una vez que las plantas presentaron la cuarta hoja (tamaño de 5 a 8 cm) se procedió a trasplantarlas en bolsas de plástico (40 x 40 cm) en el invernadero (Figura 14b). La mezcla del

sustrato utilizado en esta etapa fue tierra-‘peat moss’-agrolita en una proporción de 40-30-20.

El trasplante se realizó el 15 de marzo de 2014, durante el periodo de adaptación se fertilizó con ULTRASOL inicial 15 – 30 – 15 + ME. En este proceso se dejaron solo dos plantas por bolsa. La disposición de las bolsas y accesiones en el invernadero se muestra en la Figura 14c.

Por accesión se dispusieron diez bolsas. Las plantas adultas (Figura 14d) se fertilizaron con Triple 16 al inicio de la floración y en el periodo de llenado de grano y se les auxilió con la aplicación de un fertilizante foliar (BAYFOLAN® Forte). El control de plagas se hizo con un insecticida de amplio espectro (NUDRIN®) a dosis bajas.

Una vez establecidas las plantas, se marcaron diez de ellas por accesión, mismas a las que se les tomó todos los datos durante la caracterización morfológica, en las diferentes etapas de desarrollo. Los datos se tomaron en las etapas que marcan los descriptores.

Características evaluadas

Los descriptores utilizados fueron los propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) e International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR).

La información se registró en forma individual para cada una de las diez plantas por accesión, evaluándose tanto variables cualitativas como cuantitativas. Las

características cualitativas se evaluaron mediante apreciación visual o clasificación en base a escalas pre-establecidas (Anexo 1), mientras que las cuantitativas se basaron en mediciones utilizando una cinta métrica y una báscula. Los parámetros medidos se describen en el Cuadro 17.

Cuadro 17. Parámetros evaluados en la caracterización del germoplasma de amaranto.

Parámetro	UPOV	IBPGR	Abreviatura
Pigmentación por antocianinas	✓		X1
Pigmentación del hipocótilo por antocianinas	✓		X2
Intensidad de la coloración del hipocótilo por antocianinas	✓		X3
Forma de la hoja		✓	X4
Longitud de hoja	✓	✓	X5
Anchura de hoja	✓	✓	X6
Proporción largo/anchura de hoja	✓	✓	X7
Posición de la parte más ancha	✓		X8
Prominencia de nervaduras	✓		X9
Color principal del haz	✓	✓	X10
Distribución del segundo color en el haz	✓		X11
Color del envés	✓		X12
Margen	✓		X13
Época de aparición de inflorescencia	✓		X14
Época de floración	✓	✓	X15
Tallo: color	✓	✓	X16
Tallo: color de las rayas	✓		X17
Pecíolo: pigmentación por antocianinas	✓		X18
Pecíolo: intensidad de la pigmentación por antocianinas	✓		X19
Limbo: color principal	✓		X20
Lámina de la hoja: presencia de mancha	✓		X21
Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo	✓		X22
Limbo: color de la mancha	✓		X23
Limbo: forma de la mancha	✓		X24

Cuadro 17. (Continuación...)

Parámetro	UPOV	IBPGR	Abreviatura
Inflorescencia: color	✓	✓	X25
Inflorescencia: compacidad	✓	✓	X26
Inflorescencia: densidad de los glomérulos	✓		X27
Inflorescencia: tipo	✓		X28
Inflorescencia: hábito de crecimiento	✓		X29
Inflorescencia: porte	✓		X30
Inflorescencia: longitud	✓	✓	X31
Planta: época de madurez	✓		X32
Planta: longitud	✓	✓	X33
Tallo: pigmentación de la base por antocianinas	✓		X34
Tallo: forma de la sección transversal	✓		X35
Color de semilla	✓	✓	X36
Forma de semilla	✓		X37
Tipo de semilla	✓	✓	X38
Peso de 500 semillas	✓	✓	X39
Ramificación lateral		✓	X40
Acame		✓	X41

Análisis de datos

Primero, se realizó una clasificación de los diferentes atributos en las categorías: cualitativos binarios, cualitativos multi-estado con orden lógico, cualitativos multi-estado sin orden lógico, cuantitativos continuos y cuantitativos discretos.

La información de campo se registró en formatos pre-establecidos, con un listado de las variables en las hileras y columnas individuales para vaciar los datos de cada una de las diez plantas por accesión. Con esta información se conformó una base de datos en hoja electrónica (Excel, 2013) y posteriormente se separaron las variables en cuantitativas y cualitativas para efecto de los análisis estadísticos, utilizando los programas Statistical Analysis System (SAS) y Numerical Taxonomy System (NTSYS).

Con el fin de conocer el grado de asociación entre pares de caracteres se realizó un análisis de correlación simple entre las variables cuantitativas mediante los coeficientes de correlación simple de Pearson con el procedimiento PROC CORR del programa de SAS 9.0 (SAS Institute, 1997).

Con las variables cuantitativas se realizó un análisis univariado, obteniéndose por cada carácter morfológico como medida de tendencia central la media y como medidas de dispersión la desviación estándar, el coeficiente de variación y los valores máximos y mínimos, mediante el procedimiento PROC MEANS de SAS. También se realizó un análisis de varianza (ANOVA) para cada uno de los caracteres cuantitativos. Al encontrar diferencias significativas en cada uno de los descriptores, se hizo una prueba de Tukey con un $\alpha = 0.05$ para determinar la variabilidad de los materiales con ayuda del programa SAS 9.0 (SAS Institute, 1997). Se realizó un análisis de frecuencias de las características cualitativas por especie, para poder generar una descripción general de cada una de las especies. Además, se hizo un análisis multivariado de componentes principales para determinar las características con mayor contribución a la expresión de la variabilidad total. Finalmente, se construyeron dendrogramas usando datos cuantitativos y cualitativos de los diferentes descriptores usando el Coeficiente de Distancia Taxonómica Media (DIST) y el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973) con el programa NTSYS, para determinar las relaciones entre las accesiones y especies evaluadas.

RESULTADOS

En la Figura 15 y el Cuadro 18 se muestran algunas de las características cualitativas principales de las accesiones en estudio.



Figura 15. Amarantos de grano. a) Inflorescencia de *A. hypochondriacus*; b) hojas de *A. hypochondriacus*; c) plantas de *A. hypochondriacus*; d, e, f) plantas de *A. cruentus*.

Cuadro 18. Características cualitativas de las especies de amaranto.

Parámetro	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hybridus</i>	<i>A. retroflexus</i>	<i>A. powellii</i>	<i>A. palmeri</i>	<i>A. spinosus</i>
Pigmentación por antocianinas	Presente-ausente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Pigmentación del hipocótilo por antocianinas	presente	presente	presente	presente	presente	presente	presente
Intensidad de la coloración del hipocótilo por antocianinas	media fuerte	media, fuerte	débil	débil a media	media	media	media
Color de hoja	púrpura, verde normal, verde fuerte	hoja con margen y venas pigmentadas, verde normal	verde normal	verde normal	verde normal	verde normal	verde normal
Forma de la hoja	elíptica, rómbica	lanceolada	elíptica	ovatinada, elíptica, lanceolada	elíptica	rómbica	margen y venas pigmentadas
Posición de la parte más ancha	hacia la base	fuertemente hacia la base	en medio	en medio	en medio	moderadamente hacia la base	moderadamente hacia la base
Color del envés	verde, púrpuras	verde	verde	verde	verde	verde	verde
Tallo: color	verde	verde	verde	verde	verde	verde	verde
Tallo: color de las rayas	rojo, púrpura	rojo, púrpura	rojizo	rojizo	rojo, púrpura	rojizo	verde
Lámina de la hoja: presencia de mancha	presente, ausente	ausente	presente, ausente	ausente	ausente	ausente	ausente
Limbo: forma de la mancha	en forma de V		forma de V				
Inflorescencia: color	verde, púrpuras	verde, amarilla, púrpura	verde	verde	verde	verde	verde
Inflorescencia: compacidad	intermedia, compacta	intermedia	abierta	abierta	abierta	abierta	abierta

Cuadro 18. (Continuación...)

Parámetro	<i>A. hypochondriacus</i>	<i>A. cruentus</i>	<i>A. hybridus</i>	<i>A. retroflexus</i>	<i>A. powellii</i>	<i>A. palmeri</i>	<i>A. spinosus</i>
Inflorescencia: densidad de los glomérulos	densa	densa	media	laxa a media	laxa	densa	densa
Inflorescencia: tipo	amarantiforme	amarantiforme	amarantiforme	amarantiforme	amarantiforme	amaranto	amarantiforme
Forma de la inflorescencia	panícula con ramificaciones largas	panícula con ramificaciones cortas	panícula con ramificaciones cortas	tipo espiga	espiga	espiga	panícula con ramificaciones largas
Inflorescencia: hábito de crecimiento	indeterminado	indeterminado	indeterminado	indeterminado	indeterminado	indeterminada	indeterminado
Inflorescencia: porte	erecto, débilmente recurvado	erecto	erecto a débilmente recurvado	erecto a débilmente recurvado	recurvado	erecto, débilmente recurvado	fuertemente recurvado
Ramificación lateral	ausente, presente	ausente	presente	presente	presente	presente	presente
Acame	bajo	bajo	moderado a alto	alto	alto	alto	bajo
Color de semilla	blanca	blanca	negra	negra	negra	negra	negra
Tipo de semilla	harinosa	harinosa	cristalina	cristalina	cristalina	cristalina	cristalina

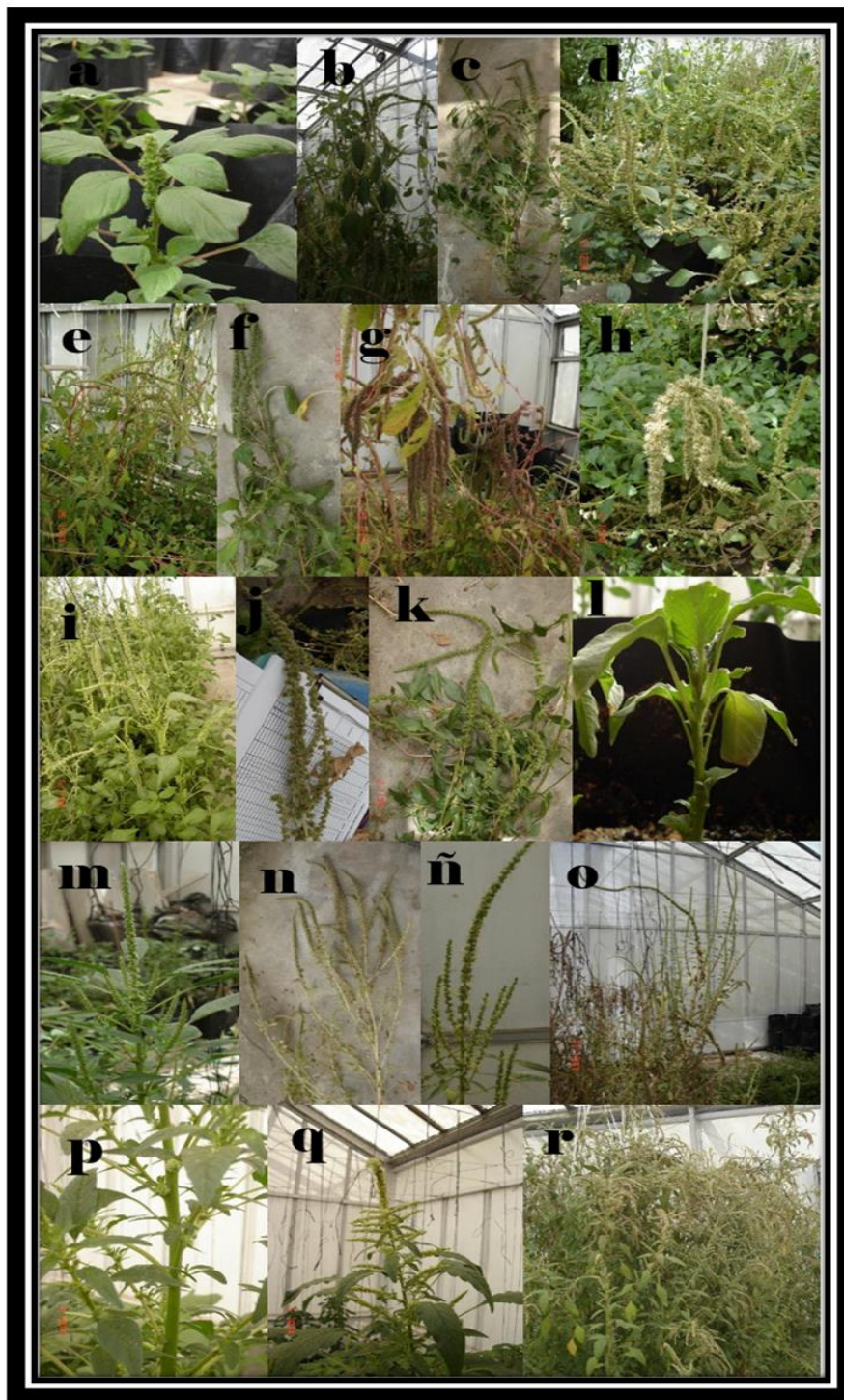


Figura 16. Características de las especies de amaranto silvestre. a, b, c, d) *A. hybridus*; e, f, g, h) *A. retroflexus*; i, j, k, l) *A. powellii*; m, n, ñ, o) *A. palmeri*; p, q, r) *A. spinosus*.

En el Cuadro 19 se presentan los coeficientes de correlación simple de Pearson obtenidos mediante el procedimiento PROC CORR del programa de SAS 9.0 (SAS Institute, 1997). Las variables ancho (X5) y largo de la hoja (X6), correlacionaron fuertemente con una significancia de 0.0001 y de manera positiva con un valor de 0.87, lo que indica que entre más larga es una hoja, también tiende a estar más ancha. Otros caracteres también fuertemente correlacionados fueron los de la época de aparición de la inflorescencia (X14) y la época de floración (X15), con un valor igual a 0.97 y significancia de 0.0001, lo que sugiere que entre más tarde la aparición de la inflorescencia, también más tardará la época de floración. La época de la aparición de la inflorescencia (X14) también correlacionó positivamente (0.83) y significancia de 0.0001 con la época de madurez (X32), lo que implica que entre más tarde la inflorescencia en aparecer, más tardará la planta en llegar a la madurez. Y por último, la época de floración (X15) estuvo correlacionada de manera positiva con la época de maduración (X32) con un valor de 0.77, con significancia de 0.0001, lo que establece que entre más tarde la aparición de la inflorescencia, más tardará la planta en alcanzar su madurez.

En el Cuadro 20 se muestran los valores promedio de las medias, desviación estándar, coeficiente de variación y máximos y mínimos de las variables cuantitativas evaluadas en este estudio para todas las accesiones, mediante el procedimiento PROC MEANS de SAS.

Cuadro 19. Coeficientes de correlación de Pearson entre las variables cuantitativas evaluadas durante la caracterización morfológica de *Amaranthus spp.*

Carácter	X5	X6	X14	X15	X31	X32	X33	X39
X5	1							
X6	0.87287 <.0001	1						
X14	0.25668 0.2155	0.14855 0.4785	1					
X15	0.20454 0.3267	0.13716 0.5133	0.97497 <.0001	1				
X31	0.07406 0.725	0.08447 0.6881	-0.3914 0.053	-0.3519 0.0845	1			
X32	0.31259 0.1282	0.05829 0.782	0.82672 <.0001	0.77521 <.0001	-0.1545 0.4608	1		
X33	0.14169 0.4993	0.04969 0.8135	0.26234 0.2052	0.34331 0.0929	0.63243 0.0007	0.44434 0.0261	1	
X39	0.53143 0.0063	0.46495 0.0192	0.62514 0.0008	0.54145 0.0052	-0.6030 0.0014	0.45431 0.0225	-0.2287 0.2714	1

X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas.

Los datos indican la existencia de variabilidad morfológica entre los materiales estudiados. Las características cuantitativas están determinadas por poligenes, genes con efectos mayores acumulativos muy afectados por el ambiente (Jacobsen y Shewood, 2002).

La característica que mostró mayor variabilidad fue la longitud de la planta (X33) (Cuadro 20), con un coeficiente de variación de 47.04 % y una desviación estándar de 53.82, esto debido a que hubo plantas con una altura mínima de 27 cm y altura máxima de 250 cm. El carácter época de aparición de la inflorescencia (X14) fue el segundo más variable con un CV= 46.44 % y una desviación estándar

igual a 26.98, esto se explica por haber encontrado plantas que iniciaron la floración a los 38 días y otras a los 164. La característica menos variable fue el ancho de la hoja (X6) con un CV= 23.91 % y una desviación estándar igual a 0.73. El carácter peso de 500 semillas (X39) mostró un CV= 33.47 % y una desviación estándar de 0.093, con un mínimo de 0.1198 g y un máximo de 0.5005 g.

Cuadro 20. Promedio, desviación estándar, coeficiente de variación y valor máximo y mínimo de la variables evaluadas durante la caracterización morfológica del género *Amaranthus spp.*

Carácter	Promedio	σ	C V (%)	Mín.	Máx.
X5 (cm)	5.122	1.5715	30.679	1.8	12.3
X6 (cm)	3.037	0.72619	23.907	1	5.9
X14 (días)	58.092	26.976	46.437	38	164
X15 (días)	76.552	29.948	39.121	56	209
X31 (cm)	38.805	13.252	34.150	8	80
X32 (días)	155.725	37.614	24.154	108	231
X33 (cm)	114.400	53.819	47.044	27	250
X39 (gr)	0.2788	0.09333	33.470	0.1198	0.5005

X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas.

Al realizar un análisis de varianza (ANOVA) de los caracteres morfológicos cuantitativos, se encontró para todos diferencias altamente significativas ($P < 0.01$) (Cuadro 21). Esto sugiere la existencia de diversidad morfológica alta entre las diferentes accesiones y especies del género *Amaranthus*.

Cuadro 21. Análisis de varianza para las características cuantitativas evaluadas durante la caracterización morfológica de accesiones de amaranto.

	G.L	SC	CM	Pr>F
X5	24	438.864397	18.2860166	<.0001
X6	24	81.4397607	3.3933234	<.0001
X14	24	171749.958	7156.2482	<.0001
X15	24	211670.591	8819.6079	<.0001
X31	24	25016.1221	1042.33842	<.0001
X32	24	333907.173	13912.7989	<.0001
X33	24	582535.646	24272.3186	<.0001
X39	24	2.05549499	0.08564562	<.0001

X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas. (P< 0.01).

Comparación de medias.

La prueba de comparación de medias Tukey con un $\alpha = 0.05$ mostró diferencias significativas para todos los caracteres cuantitativos en estudio (Cuadro 22). Para la variable longitud de hoja (X5) se encontró que la accesión THYP de *A. hypochondriacus* tuvo el mayor promedio con un valor de 9.14 cm, mientras que las hojas más pequeñas se observaron en las accesiones de *A. palmeri* 27PALM (3.9 cm) y 36PALM (3.7 cm), y en la accesión 40RETR de *A. retroflexus* con 2.6 cm.

Para el carácter ancho de hoja (X6), las accesiones THYP, RHYP y 27HYP de *A. hypochondriacus* mostraron las hojas más anchas con valores de 4.44, 3.9 y 4.08 cm, respectivamente; mientras que las hojas más angostas pertenecieron a las accesiones de *A. retroflexus* (40RETR), *A. palmeri* (35PALM, 36PALM) y *A. spinosus* (47SPIN). Para la variable época de aparición de la inflorescencia (X14) el material más tardío fue la accesión PHYP de *A. hypochondriacus* con 164 días,

mientras que la accesión más precoz fue 39HYB de *A. hybridus*, con solo 38 días. Para la característica época de floración (X15) el material más tardío fue PHYP de *A. hypochondriacus* con un promedio de 209 días, mientras que los más precoces fueron 49POW y 50POW de *A. powellii* con 56 días en promedio y 34RETR de *A. retroflexus* también con 56 días.

Para la longitud de la inflorescencia (X31) hubo gran cantidad de materiales con mayor longitud y estadísticamente iguales: la accesión THYP de *A. hypochondriacus* con un valor igual a 47.9 cm, una accesión de *A. hybridus* (43HYB) con 46.6 cm, las accesiones 26RETR y 38RETR de *A. retroflexus* con 42.5 y 52.4 cm, respectivamente; *A. powellii* con las accesiones 48POW (46.6 cm), 50POW (47.7 cm), *A. palmeri* con 27PALM (45.125 cm), 33PALM (52.11 cm) y 36PALM (51.5 cm); y por último, la especie *A. spinosus* con la accesión 47SPIN con un promedio de 57.6 cm; mientras que los materiales que mostraron inflorescencias más cortas fueron las accesiones 78CRU (27.1 cm), 41CRU (27.2 cm) y 42CRU (26.3 cm) de *A. cruentus*, una accesión de *A. hybridus* (39HYB) con 26.9 cm y por último una accesión a *A. retroflexus* (40RETR) con 12.8 cm en promedio.

Para la variable época de madurez (X32), las accesiones más tardías fueron PHYP de *A. hypochondriacus* y 40RETR de *A. retroflexus* con 231 días, mientras el material más precoz fue 26RETR de *A. retroflexus* con 108 días.

Cuadro 22. Prueba de comparación de medias Tukey ($p < 0.05$) entre las accesiones de *Amaranthus* para las características morfológicas cuantitativas estudiadas.

Carácter/Accesión	X5	X6	X14	X15	X31	X32	X33	X39
THYP	9.14a	4.44a	72e	90e	47.9abc	219c	182.4abc	0.40c
RHYP	7.07b	3.9abc	66f	77h	37.6bcde	164f	85.2fghi	0.38f
NHYP	6.98bc	3.42bcd	72e	92d	38.2bcde	197d	151.5bcd	0.27j
PHYP	6.77bc	4.08ab	164a	209 a	29.28de	231a	200.71a	0.50a
78CRU	5.64cdef	3.18cde	61g	74i	27.1ef	162g	51.4ij	0.39e
92CRU	6.61bcd	3.33bcd	61g	71k	33.1cde	162g	61.3ghij	0.38g
41CRU	5.08efgh	2.9defg	75d	81f	27.2ef	162g	63.6ghij	0.40d
42CRU	4.9efgh	2.87defg	75d	79g	26.3ef	162g	57.5hij	0.41b
28HYB	4.41fgh	3.19cde	42j	58p	34.9cde	111m	95.2efg	0.23l
39HYB	4.2gh	2.84defg	38m	62m	26.9ef	131k	42.1j	0.22n
43HYB	4.22gh	2.99def	42j	59 o	46.3abc	132j	105.9ef	0.20u
44HYB	4.07gh	2.53efg	42j	62m	35.2cde	133i	57hij	0.21q
40RETR	2.61i	1.71h	110b	137b	12.8f	231a	94fgh	0.34h
26RETR	4.87fgh	3.38bcd	45h	72j	42.5abcd	108n	131.6de	0.20v
34RETR	5.22defg	3.38bcd	40k	56q	39.2bcde	122l	85.1fghi	0.21s
38RETR	5.02efgh	3.29cde	45h	61n	52.4ab	183e	187.4ab	0.21r
46POW	4.82fgh	2.92def	43i	66l	40.3bcde	122l	96.5efg	0.22 o
48POW	4.44fgh	3.23cde	39l	62m	46.6abc	122l	106.2ef	0.21t
49POW	6.29bcde	3.21cde	39l	56q	40.4bcde	122l	106.3ef	0.23m
50POW	4.27fgh	2.9defg	39l	56q	47.7abc	122l	101.5ef	0.28i
27PALM	3.97ghi	2.66defg	40k	62m	45.12abc	145h	168.13abcd	0.16x
33PALM	4.61fgh	2.52efg	40k	62m	52.11ab	145h	178.44abc	0.2w
35PALM	4.28fgh	2.24fgh	40k	62m	35.85cde	145h	148.57cd	0.26k
36PALM	3.71hi	2.35fgh	40k	62m	51.5ab	145h	179.17abc	0.22p
47SPIN	4.24gh	2.14gh	96c	111c	57.6 ^a	227b	202.5 a	0.11y

X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas. Accesiones con la misma letra, son estadísticamente iguales.

Para el descriptor longitud de planta (X33) se obtuvo que las plantas más grandes correspondieron a PHYP de *A. hypochondriacus* con un valor de 200.71 cm. Las accesiones de *A. palmeri* mostraron los valores siguientes: 27PALM con 168.13

cm, 33PALM con 178.44 cm y 36PALM con 179.17 cm; y por último, la accesión 38RETR de *A. retroflexus* mostró una altura de 187.4 cm en promedio.

Finalmente, para la característica peso de 500 semillas (X39), las semillas más pesadas las mostró la accesión PHYP de *A. hypochondriacus* con un peso de 0.5005 g, mientras las semillas más ligeras las tuvo 47SPIN de *A. spinosus* con un valor de 0.1198 g.

Análisis de componentes principales

Cinco componentes principales (CP) explicaron el 97.72 % de la variabilidad total (Cuadro 23). El CP1 explicó el 45.70 %, mientras que cuatro componentes explicaron el resto.

Cuadro 23. Eigen valores de los componentes principales para las variables evaluadas durante la caracterización morfológica de las accesiones de amaranto.

CP	Eigen valores	Porcentaje	Acumulado
1	3.65616973	45.7021	45.7021
2	1.90678439	23.8348	69.5369
3	1.79121409	22.3902	91.9271
4	0.29252715	3.6566	95.5837
5	0.17118424	2.1398	97.7235
6	0.11546512	1.4433	99.1668
7	0.05795618	0.7245	99.8913
8	0.00869909	0.1087	> 100%

Las variables cuantitativas que más contribuyeron al CP1 fueron la época de aparición de la inflorescencia (X14), la época de floración (X15), la época de madurez de la planta (X32) y el peso de las semillas (X39) (Cuadro 24). Para el CP2, que explicó el 23.83 % de la variación total, las variables que más aportaron a la variación son la longitud de la inflorescencia (X31) y la longitud de la planta (X33). Para el CP3 que explicó el 22.39 % de la variación total, las variables que más contribuyen son la longitud de la hoja (X5) y el ancho de la hoja (X6).

Cuadro 24. Contribución de las variables morfológicas a los primeros cuatro componentes principales.

Variable	C1 (45.70 %)	C2 (23.83 %)	C3 (22.39 %)	C4 (3.65 %)
X5	0.5553	0.2780	0.7432	0.1607
X6	0.4291	0.2168	0.8369	-0.2071
X14	0.9269	-0.0102	-0.3229	-0.1236
X15	0.8880	0.0489	-0.3652	-0.2585
X31	-0.4025	0.8756	0.0938	0.0188
X32	0.8186	0.2345	-0.3487	0.3605
X33	0.2164	0.8960	-0.2866	-0.0615
X39	0.7981	-0.3945	0.2970	0.0871

X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas.

En la Figura 18 se muestran gráficos en dos y tres dimensiones (2D y 3D, respectivamente) del ordenamiento de las variables cuantitativas según los componentes principales. Se observó fuerte asociación entre las variables de largo y ancho de la hoja (X5 y X6), así como también entre las variables relacionadas a

época de aparición de la inflorescencia (X14), época de floración (X15) y época de madurez de la planta (X32).

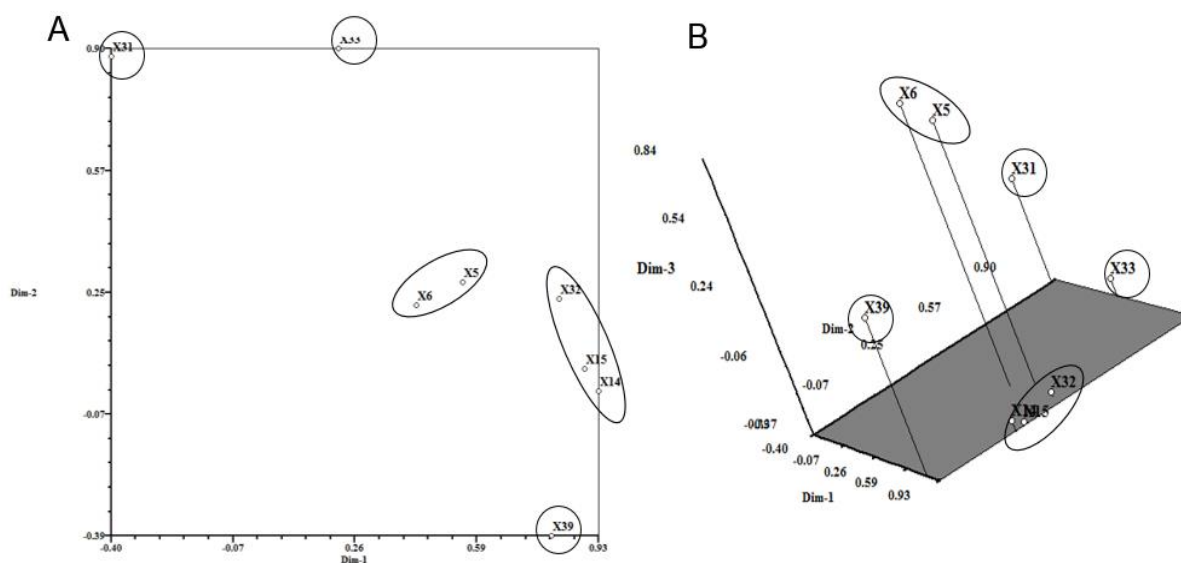


Figura 17. Gráficas en 2 y 3 dimensiones resultantes del análisis de componentes principales de variables cuantitativas morfológicas de amaranto. X5: longitud de hoja; X6: ancho de hoja; X14: época de aparición de inflorescencia; X15: época de floración; X31: longitud de inflorescencia; X32: época de madurez de la planta; X33: longitud de la planta; X39: peso de 500 semillas. A) Gráfico en 2D, B) gráfico en 3D.

En la Figura 19 se presentan gráficos en dos y tres dimensiones (2D (A) y 3D (B), respectivamente) mostrando el ordenamiento de las accesiones caracterizadas de amaranto. Se observa la formación de cinco grupos. El grupo I incluyó a accesiones de las especies *A. palmeri* (33PALM, 36PALM, 27PALM), *A.*

retroflexus (38RETR) y *A. spinosus* (47SPIN). En el grupo II se ordenaron accesiones de las especies *A. retroflexus* (26RETR, 34RETR), *A. palmeri* (35PALM), *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW) y la especie *A. hybridus* (28HYB, 39HYB, 43HYB, 44HYB). En el grupo III se tuvo a los amarantos cultivados correspondientes a las especies *A. hypochondriacus* (THYP, NHYP, RHYP) y *A. cruentus* (92CRU, 78CRU, 41CRU, 42CRU). Los grupos IV y V los formaron las accesiones individuales PHYP y 40RETR, respectivamente.

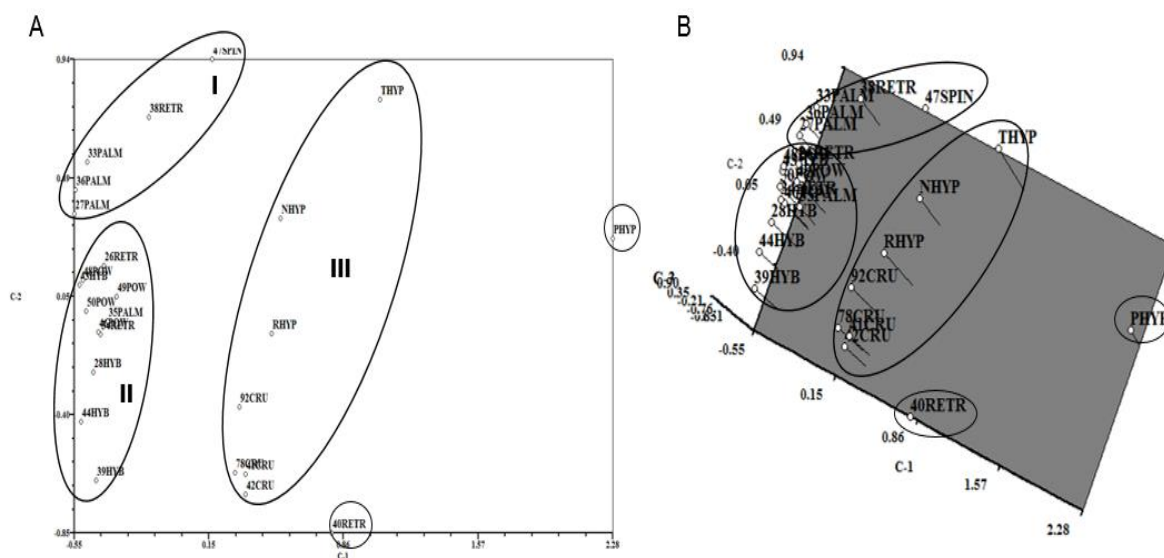


Figura 18. Agrupación de las accesiones de amaranto según el análisis de componentes principales. A) Gráfico en 2D, B) gráfico en 3D.

Construcción del dendrograma y determinación de relaciones entre las accesiones de amaranto

Todas las características que mostraron polimorfismo tanto cuantitativas como cualitativas de ambos descriptores (UPOV e IBPGR) por separado, se utilizaron para realizar análisis de conglomerados con el método de UPGMA, el cual se basó en la obtención de una matriz de distancias entre las accesiones usando el coeficiente DIST (distancia taxonómica media) y con las matrices generadas se construyeron los dendrogramas correspondientes.

Con los datos de descriptores de IBPGR se obtuvo el dendrograma de la Figura 20, donde se observa la formación de dos grupos. El grupo I incluyó a materiales cultivados de la especie *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, donde los materiales más relacionados fueron las accesiones THYP y NHYP, así como 78CRU y 92CRU, mientras que el más alejado fue la accesión PHYP.

El grupo II se formó con los materiales silvestres y algunos cultivados. Dentro de éste grupo los genotipos cultivados RHYP, 41CRU y 42CRU formaron un subgrupo bastante compacto que se separa claramente de los genotipos silvestres. A la vez los materiales silvestres se pueden diferenciar en tres subgrupos, el primero lo integraron genotipos pertenecientes a las especies *A. powellii* (48POW, 46POW, 50POW, 49POW), *A. hybridus* (28HYB, 43HYB, 39HYB, 44HYB) y *A. retroflexus* (34RETR, 26RETR, 38RETR). El segundo subgrupo se integró con los materiales de *A. palmeri* (27PALM, 36PALM, 33PALM, 35PALM), mostrando estar claramente distanciados de los genotipos silvestres del subgrupo I. Finalmente, el subgrupo III se formó con el material de la

especie *A. spinosus* (47SPIN) y fue el más distante de todos los genotipos silvestres evaluados.

Con los datos de descriptores morfológicos propuesto por UPOV se obtuvo un segundo dendrograma (Figura 21). En él se observa la formación de cuatro grupos. El grupo I lo formó la accesión THYP de *A. hypochondriacus*. El grupo II se integró tanto con especies cultivadas como con silvestres, donde las accesiones RHYP, 78CRU, 92CRU, 41CRU, 42CRU de las especies cultivadas forman un grupo compacto y se distancian claramente de los materiales silvestres.

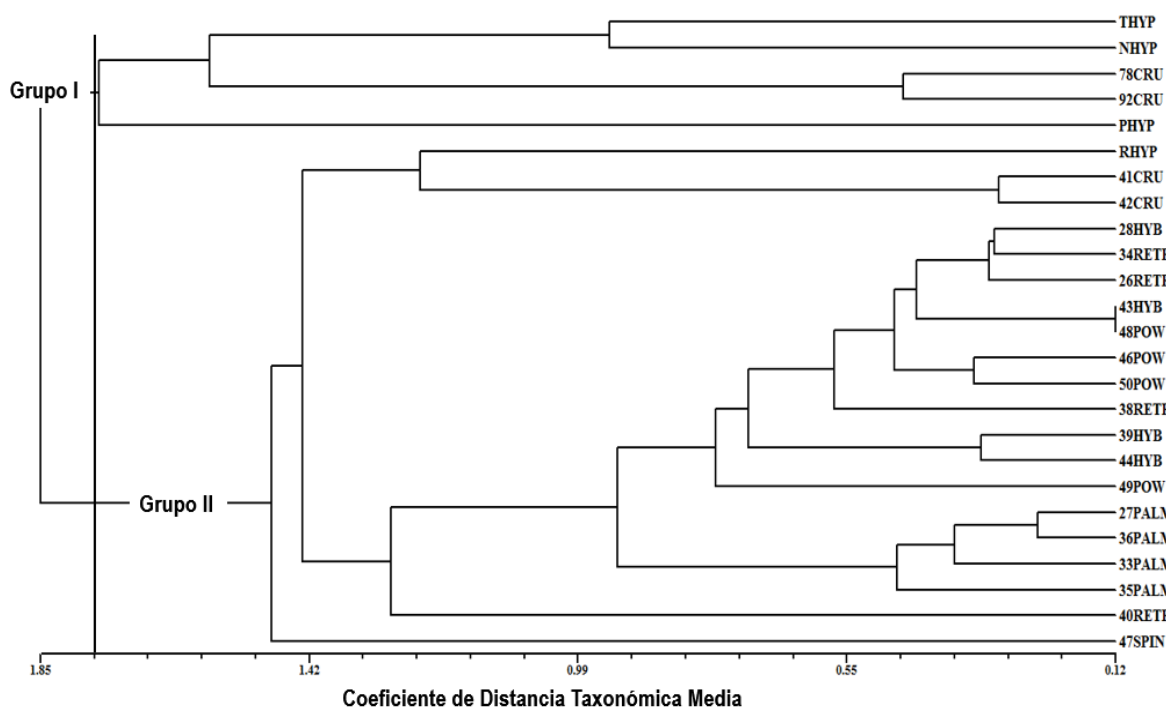


Figura 19. Dendrograma obtenido usando datos de los descriptores morfológicos propuestos por IBPGR para la caracterización de las accesiones de amaranto.

Entre los materiales silvestres se observó un subgrupo bastante relacionado formado por genotipos de las especies *A. hybridus* (28HYB y 43HYB), *A. retroflexus* (26RETR, 34RETR y 38RETR), *A. powellii* (48POW, 46POW, 50POW y 49POW) y *A. palmeri* (27PALM, 33PALM, 36PALM, 35PALM). El genotipo 47SPIN de *A. spinosus* y el 40RETR de *A. retroflexus*, se diferenciaron de todos los silvestres formando un 'outlier'. El grupo III lo formó PHYP de *A. hypochondriacus* y el grupo IV por NHYP, también de *A. hypochondriacus*.

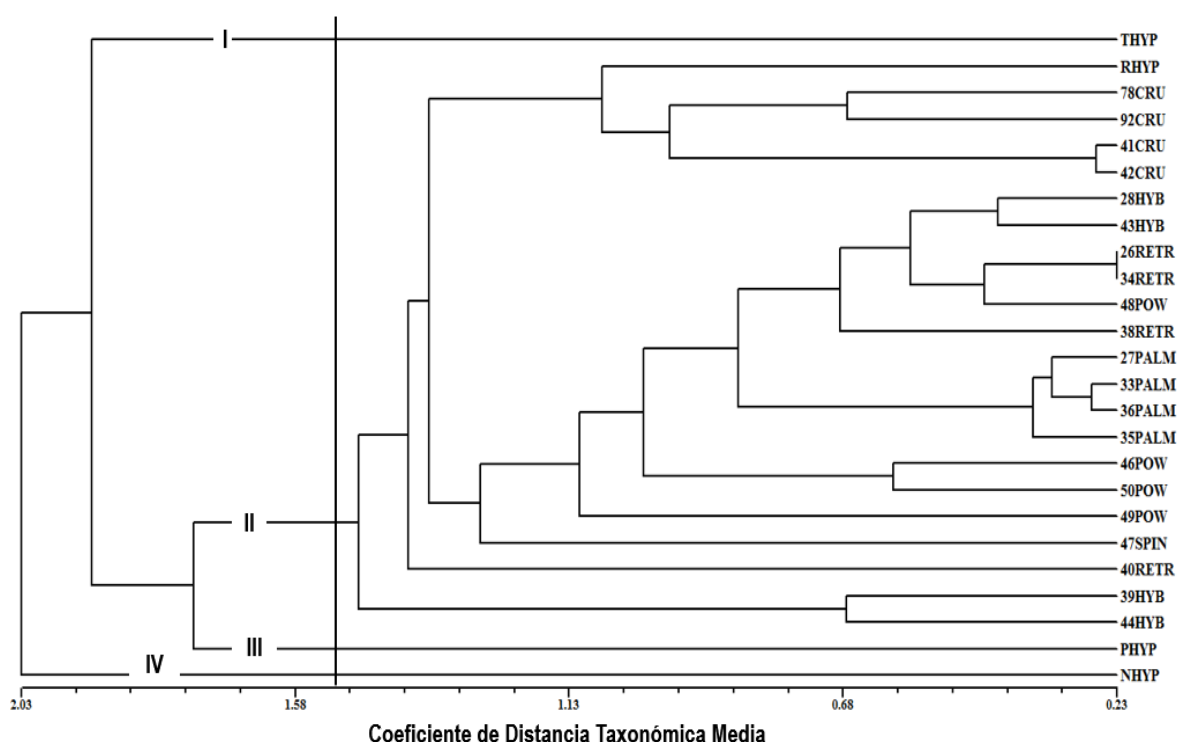


Figura 20. Dendrograma obtenido usando descriptores morfológicos de UPOV para la caracterización de accesiones de amaranto.

El análisis conjunto de los dendrogramas generados usando los dos tipos de descriptores indica que las especies cultivadas *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están muy relacionadas entre sí y diferenciadas de las especies silvestres. Entre las especies silvestres, aquellas más relacionadas son *A. hybridus* y *A. retroflexus*, siguiéndoles *A. powellii*, *A. palmeri* y *A. spinosus*, esta última es más alejada.

Prueba de Mantel entre las matrices de datos morfológicos (UPOV vs IBPGR)

El valor de correlación obtenido mediante una prueba de Mantel (Figura 22) al comparar las matrices generadas con los datos cuantitativos más cualitativos registrados usando los descriptores propuestos por UPOV e IBPGR fue de $r = 0.77$. Ello sugiere que existe alguna discrepancia entre los árboles o dendrogramas generados usando datos de uno u otro tipo de descriptor. Según los agrupamientos de los dendrogramas se observa que los descriptores de IBPGR son los mejores porque reflejan o muestran mejor las relaciones genéticas existentes entre las accesiones y especies evaluadas. Es decir, los descriptores de IBPGR permiten agrupaciones más congruentes en comparación con los resultados de los descriptores propuestos por UPOV. En la Figura 22 se muestra la correlación detectada entre las matrices.

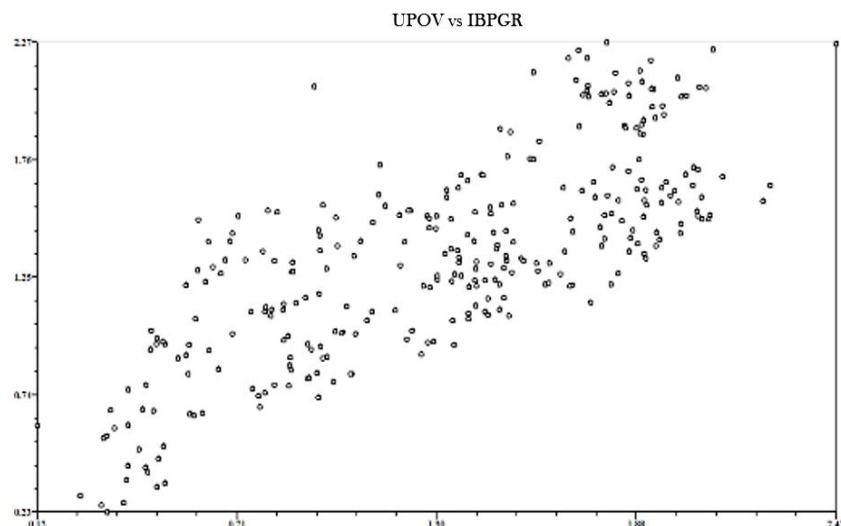


Figura 21. Gráfico de la correlación entre las matrices generadas utilizando los descriptores propuestos por UPOV vs IBPGR, según la Prueba de Mantel.

DISCUSIÓN

Durante el proceso de la caracterización morfológica deben registrarse aquellos caracteres altamente heredables, que puedan ser evaluados fácilmente, a simple vista y que se expresen en todos los ambientes (IPGRI, 1995).

En el presente trabajo se detectó la existencia de amplia variabilidad genética dentro del género *Amaranthus*. Estos resultados coinciden con los reportados por Joshi *et al.* (2011). Estos autores reportaron correlación alta y positiva entre las características largo y ancho de las hojas, lo que es avalado también en trabajos realizados por Mapes *et al.* (1996) y Ruiz *et al.* (2013), mientras que Vujačić (2005) reporta correlación entre la altura de la planta y la longitud de la hoja, así como entre el largo y ancho de la hoja.

El análisis de componentes principales indicó que las variables que contribuyen en mayor proporción a la variabilidad genética de *Amaranthus* son las correspondientes a las hojas (largo y ancho), a la altura de las plantas y a la longitud de la inflorescencia. Estos resultados coinciden con lo reportado por Vujačić (2005), quien menciona que la altura de planta y las características de la hoja contribuyen a la variabilidad en el primer componente, mientras que Wu *et al.* (2000) reportan para el primer componente a las características de número de hojas, diámetro del tallo, altura de la planta, tamaño de grano y número de ramas y para el segundo componente, al período de crecimiento y el rendimiento por planta.

Por otro lado, Teixeira *et al.* (2003) reportaron que los dos primeros componentes principales explican el 92.18 % de la variabilidad total y que las características que aportan esto son la altura de planta y el tamaño de la inflorescencia. También, Mapes *et al.* (1996) indican que las características de hoja, el peso de inflorescencia, raíz, tallo y hojas son las que mejor contribuyen a la variación total en los componentes principales.

Pan *et al.* (1992) encontraron que los días a cosecha, el rendimiento total y características de la hoja contribuyen a la diversificación de los materiales, mientras que Xiao *et al.* (2000), también mencionan que las características de hoja son las más prácticas para la clasificación de los materiales. Además, Mwase *et al.* (2014) reportan que los datos cualitativos de hábito de crecimiento, pigmentación del tallo y la ramificación son los que mejor contribuyen a la variabilidad.

En los análisis de agrupamiento se nota una asociación entre los materiales cultivados. Mandal y Das (2002) y Legaria (2010) reportan la asociación entre los materiales cultivados de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras *A. cruentus* es la especie distante entre las cultivadas. La cercanía que se presenta entre los materiales cultivados con algunos materiales silvestres (*A. hybridus*, *A. retroflexus* y *A. powellii*), apoya la teoría de que estos últimos son los probables progenitores de los materiales cultivados. Chan y Sun (1997) y Mandal y Das (2002) avalan la hipótesis de un origen monofilético y mencionan a *A. hybridus* como posible progenitor de los amarantos cultivados. Xu y Sun (2001) reportan la asociación que se da entre los materiales cultivados y *A. hybridus* así como *A. powellii*, mientras que Pandey (1999) en sus estudios meióticos, reporta la homología genómica existente entre los materiales de *A. cruentus*, *A. retroflexus* y *A. powellii*.

La relación existente entre los materiales silvestres de *A. hybridus* y *A. retroflexus* concuerda con lo reportado por Wasson y Tranel (2005), quienes mencionan que estos dos materiales silvestres forman un clúster. También se observa el distanciamiento existente de *A. spinosus* y *A. palmeri* de todas las accesiones en estudio, la separación de estos materiales es semejante con lo reportado por Wasson y Tranel (2005), quienes reportan en su estudio con AFLP la unión en un clúster de estos dos materiales. En general se observaron grupos definidos por especies cultivadas relacionadas con algunos materiales silvestres lo que los sugiere como posibles progenitores de los materiales cultivados, tal como menciona Das (2011).

La gran variabilidad de resultados existentes como producto de las caracterizaciones morfológicas realizadas por diferentes autores se debe principalmente al origen de los materiales evaluados y a la enorme variación morfológica y genética que presenta el género *Amaranthus*, así como a la sensibilidad a la luz de algunos materiales (Wu *et al.*, 2000; Rivelli *et al.*, 2008). Wu *et al.* (2000) al comparar dos sitios experimentales encuentran diferente comportamiento entre los materiales, por estas razones Costea *et al.* (2006) menciona que aunque los criterios morfológicos básicos pueden aplicarse a los especímenes de herbario o colecciones de germoplasma para la identificación taxonómica rápida, los datos morfológicos por sí solos pueden ser engañosos y deben acompañarse de caracterizaciones moleculares.

CONCLUSIONES

Los caracteres que más contribuyeron al total de la variabilidad en *Amaranthus* fueron los correspondientes a las características de la hoja (largo y ancho), el peso de 500 semillas, la época de aparición de la inflorescencia, época de floración, época de maduración, la longitud de la inflorescencia y la altura de la planta. Las características más correlacionadas fueron el largo y ancho de la hoja. Los descriptores más útiles para relacionar y diferenciar especies y accesiones de *Amaranthus* fueron los propuestos por IBPGR. Existe relación entre los materiales cultivados y los materiales silvestres (*A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*) lo cual apoya la teoría de posibles progenitores de los materiales cultivados.

BIBLIOGRAFÍA

- Becerra, V. y Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura Técnica* 60(3):270-281.
- Chan, K. F. and Sun, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theoretical and Applied Genetics* 95(5):865-873.
- Costea, M.; Brenner, D. M.; Tardif, F. J.; Tan, Y. F. and Sun, M. 2006. Delimitation of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus caudatus* L. using micromorphology and AFLP analysis: an application in germplasm identification. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53(8):1625-1633.
- Das, S. 2011. Systematics and taxonomic delimitation of vegetable, grain and weed amaranths: a morphological and biochemical approach. *Genetic Resources and Crop Evolution* 59(2):289-303.
- Espitia R., E.; Mapes S., E. C.; Núñez C., C. A. y Escobedo L., D. 2010. Distribución geográfica de las especies cultivadas de *Amaranthus* y de sus parientes silvestres en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 1(3):427-437.
- 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.
- IPGRI. 1995. Descriptors for *Capsicum spp.* Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Secretariat. Roma, Italia. 32 p.

- Jacobsen, S. E. y Shewood, S. 2002. Cultivo de granos andinos en Ecuador: informe sobre los rubros quinua, chocho y amaranto. Quito, Ecuador, FAO-Centro Internacional de la Papa-Catholic Relief Service. 14 p.
- Jaramillo, S. y Baena, M. 2000. Material de apoyo a la capacitación en conservación *ex-situ* de recursos fitogenéticos. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos. Cali, Colombia. 210 p.
- Joshi, V.; Vijaya, M.; Sireesha, K. and Madhavi L., P. 2011. Characterization and preliminary evaluation of vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.). Vegetable Science 38(2):239-240.
- Kauffman, C. S. and Reider, C. 1986. Amaranth germplasm collection. Rodale Press Inc. Emmaus. P. A. 114 p.
- Legaria S., J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). Revista Fitotecnia Mexicana 33(2):89-95.
- Mandal, N. and Das, P. K. 2002. Intra- and Interspecific Genetic Diversity in Grain Amaranthus Using Random Amplified Polymorphic DNA Markers. Plant Tissue Culture 12(1):49-56.
- Mapes, C.; Caballero, J.; Espitia, E. and Bye, R. A. I. 1996. Morphophysiological variation in some Mexican species of vegetable *Amaranthus*: evolutionary tendencies under domestication. Genetic Resources and Crop Evolution 43: 283-290.

- Mwase, W. F.; Kachiguma, N.; Manduwa, D. and Maliro, M. 2014. Agromorphological diversity of *Amaranthus* species in Central Malawi. International Journal of AgriScience 4(4):235-241.
- Pan, R. S.; Sirohi, P. S. and Sivakami N. 1992. Genetic divergence in vegetable amaranths. Indian Journal of Horticulture 49(2): 183–186.
- Pandey, R. M. 1999. Evolution and improvement of cultivated amaranths with reference to genome relationship among *A. cruentus*, *A. powellii* and *A. retroflexus*. Genetic Resources and Crop Evolution 46(3):219-224.
- Rivelli, A. R.; Gherbin, P.; De M, S. and Pizza, S. 2008. Field Evaluation of *Amaranthus* Species for Seed and Biomass Yields in Southern Italy. The Italian Journal of Agronomy. Rivista di Agronomia 3:225-229.
- Ruiz H., V. C.; De la O O., M.; Espitia R., E.; Sangerman J., D. M.; Hernández C., J. M. y Schwentesius R., R. 2013. Variabilidad cualitativa y cuantitativa de accesiones de amaranto determinada mediante caracterización morfológica. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 4(5):789-801.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT Software: Changes and Enhancements through Release 6.12. SAS Institute, Cary, N.C.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman y Co. 573p.
- Teixeira, D. L.; Spehar, C. R. and Copati S., L. A. 2003. Caracterização agrônômica de amaranto para cultivo na entressafra no Cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira 38(1):45-51.

- Vujačić, V. 2005. Variability and factor analysis of morphological and productive characteristics of species of the genus *amaranthus*. *Genetika* 37(1):1-13.
- Wassom, J. J. and Tranel, P. J. 2005. Amplified fragment length polymorphism-based genetic relationships among weedy *Amaranthus* species. *The journal of heredity* 96(4):410-416.
- Wu, H.; Sun, M.; Yue, S.; Sun, H.; Cai, Y.; Huang, R.; Brenner, D. and Corke, H. 2000. Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(1):43–53.
- Xiao, S. G.; Liu, Z. M.; Song, Y. and Yang, G. 2000. Classification of vegetable amaranth variety resources. *Journal of Hunan Agricultural University* 26(4):274–277.
- Xu, F. and Sun, M. 2001. Comparative Analysis of Phylogenetic Relationships of Grain Amaranths and Their Wild Relatives (*Amaranthus*; *Amaranthaceae*) Using Internal Transcribed Spacer, Amplified Fragment Length Polymorphism, and Double-Primer Fluorescent Intersimple Sequence Repeat Markers. *Molecular Phylogenetics and Evolution* 21(2):372-387.

IV. CARACTERIZACIÓN MORFOLÓGICA VS MOLECULAR DE ACCESIONES DE AMARANTO

RESUMEN

La familia *Amaranthaceae* comprende 60 géneros y cerca de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical, que se adaptan bien a diferentes tipos de climas. Esta gran adaptabilidad presente dentro de las especies de amaranto da una idea acerca de la diversidad genética inherente a la familia *Amaranthaceae*, donde este rasgo es la base para la supervivencia a largo plazo de las especies y la adaptación. Conocer el grado de similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores. Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar 25 accesiones del género *Amaranthus* mediante marcadores morfológicos (descriptores de UPOV e IBPGR) y moleculares del tipo ISSR, establecer los agrupamientos que generan los diferentes tipos de marcadores y comparar su capacidad para diferenciar las especies de *Amaranthus*. Todas las variables morfológicas cuantitativas y cualitativas estudiadas mostraron variación continua, lo que significa que son características determinadas por poli genes e interaccionan con el ambiente. Los resultados de la prueba de Mantel para asociación entre las matrices derivadas de datos moleculares y morfológicos indicaron correlaciones muy bajas, mostrando que los tipos de marcadores evalúan *loci* no relacionados y discriminan de manera muy diferente entre los genotipos.

INTRODUCCIÓN

La familia *Amaranthaceae* comprende 60 géneros y cerca de 800 especies de hierbas anuales de origen tropical, que se adaptan bien a climas templados. Sus principales centros de distribución son los trópicos de América y la India, aun cuando en los trópicos de África y Australia existe un número importante de especies (Feine *et al.*, 1979). Esta gran adaptabilidad presente dentro de las especies de amaranto da una idea acerca de la diversidad genética inherente a la familia *Amaranthaceae*, donde este rasgo es la base para la supervivencia a largo plazo de las especies y la adaptación que hace que sea posible continuar y avanzar en los procesos evolutivos (Hamrick y Godt, 1996; Rao, 2004).

Conocer el grado de similitud entre los individuos y las poblaciones es de gran utilidad en los programas de mejoramiento genético, pues permite, además de la organización del material, la selección adecuada de los genotipos superiores y la complementación con datos fenotípicos y agronómicos para el desarrollo de una población mejorada (Becerra y Paredes, 2000).

Todos los genes cumplen funciones determinadas y sus efectos pueden o no expresarse en características identificables de forma visual. Esto quiere decir que hay una variabilidad que se puede detectar a simple vista (variabilidad morfológica) y otra que, aunque no es visible fácilmente, también existe en la especie (variabilidad molecular) pero que requieren de técnicas especiales para ser detectadas mediante caracterización morfológica y molecular, respectivamente (Hidalgo, 2003).

Los objetivos del presente trabajo fueron caracterizar 25 accesiones del género *Amaranthus* mediante marcadores morfológicos (descriptor de UPOV e IBPGR) y moleculares del tipo ISSR, establecer los agrupamientos que generan los diferentes tipos de marcadores y comparar su capacidad para diferenciar las especies de *Amaranthus*, así como conocer la correlación existente entre los marcadores.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Se estudiaron 25 accesiones nacionales de amaranto provenientes del Programa de Recursos Genéticos del INIFAP, Campo Experimental Valle de México ubicado en Santa Lucía de Prías, municipio de Texcoco, México (Cuadro 25).

Caracterización morfológica

El estudio se realizó en invernaderos de cristal (tipo rústico, sin calefacción) del Posgrado de Horticultura, perteneciente al Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma de Chapingo en los meses de Febrero a Octubre del 2014. La Universidad se localiza en el Estado de México, entre las coordenadas 19° 29'34.61" LN, 98° 53'06.93" LO a 2254 msnm.

Cuadro 25. Lista de accesiones de amaranto utilizadas, correspondientes a especies cultivadas y silvestres.

Especie	Accesión	Abreviación
<i>A. hypochondriacus</i>	Tlax-089	THYP
	Revancha	RHYP
	Nutrisol	NHYP
	Pue-027	PHYP
<i>A. cruentus</i>	Gto-078	78CRU
	Gto-092	92CRU
	Mor-041	41CRU
	Mor-042	42CRU
<i>A. hybridus</i>	Silv-28	28HYB
	Silv-39	39HYB
	Silv-43	43HYB
	Silv-44	44HYB
	Silv-40	40RETR
<i>A. retroflexus</i>	Silv-26	26RETR
	Silv-34	34RETR
	Silv-38	38RETR
	Silv-46	46POW
<i>A. powellii</i>	Silv-48	48POW
	Silv-49	49POW
	Silv-50	50POW
<i>A. palmeri</i>	Silv-27	27PALM
	Silv-33	33PALM
	Silv-35	35PALM
	Silv-36	36PALM
<i>A. spinosus</i>	Silv-47	47SPIN

Se sembró semillas de amaranto en un almácigo el 8 de febrero de 2014, en charola de poliestireno tipo forestal con 60 cavidades redondas de 250 x 600 x 120 mm. Una vez que las plantas germinaron y presentaron la cuarta hoja (tamaño de 5 a 8 cm) se procedió a trasplantarlas en bolsas de plástico (40 x 40) en el invernadero. La mezcla del sustrato utilizado fue tierra-‘peatmoss’-agrolita en una proporción de 40-30-20. Los descriptores utilizados fueron los propuestos por la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) e International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR). La información de campo se registró en forma individual en diez plantas por accesión, para las cuales se anotó por accesión y por planta los datos de cada una de las variables cualitativas y cuantitativas. Las características cualitativas se evaluaron mediante apreciación visual o clasificación en base a escalas preestablecidas (Anexo 1), mientras que las cuantitativas se basaron en mediciones, utilizando una cinta métrica y una báscula. Los parámetros medidos se describen en el Cuadro 26.

Cuadro 26. Parámetros evaluados en la caracterización del germoplasma de amaranto.

Parámetro	UPOV	IBPGR	Abreviatura
Pigmentación por antocianinas	✓		X1
Pigmentación del hipocótilo por antocianinas	✓		X2
Intensidad de la coloración del hipocótilo por antocianinas	✓		X3
Forma de la hoja		✓	X4
Longitud de hoja	✓	✓	X5
Ancho de hoja	✓	✓	X6
Proporción largo/ancho de hoja	✓	✓	X7

Cuadro 26. (Continuación...)

Parámetro	UPOV	IBPGR	Abreviatura
Posición de la parte más ancha	✓		X8
Prominencia de nervaduras	✓		X9
Color principal del haz	✓	✓	X10
Distribución del segundo color en el haz	✓		X11
Color del envés	✓		X12
Margen	✓		X13
Época de aparición de inflorescencia	✓		X14
Época de floración	✓	✓	X15
Tallo: color	✓	✓	X16
Tallo: color de las rayas	✓		X17
Pecíolo: pigmentación por antocianinas	✓		X18
Pecíolo: intensidad de la pigmentación por antocianinas	✓		X19
Limbo: color principal	✓		X20
Lámina de la hoja: presencia de mancha	✓		X21
Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo	✓		X22
Limbo: color de la mancha	✓		X23
Limbo: forma de la mancha	✓		X24
Inflorescencia: color	✓	✓	X25
Inflorescencia: compacidad	✓	✓	X26
Inflorescencia: densidad de los glomérulos	✓		X27
Inflorescencia: tipo	✓		X28
Inflorescencia: hábito de crecimiento	✓		X29
Inflorescencia: porte	✓		X30
Inflorescencia: longitud	✓	✓	X31
Planta: época de madurez	✓		X32
Planta: longitud	✓	✓	X33
Tallo: pigmentación de la base por antocianinas	✓		X34
Tallo: forma de la sección transversal	✓		X35
Color de semilla	✓	✓	X36
Forma de semilla	✓		X37
Tipo de semilla	✓	✓	X38
Peso de 500 semillas	✓	✓	X39
Ramificación lateral		✓	X40
Acame		✓	X41

Caracterización molecular

Para la obtención del material vegetal, se sembraron semillas en 10 vasos de unicel por accesión, dejando crecer de tres a cinco plantas por vaso para la extracción del ADN. La purificación del ADN se hizo de acuerdo al protocolo de De la Cruz *et al.* (1997), con algunas modificaciones. La concentración del ADN se cuantificó usando un espectrofotómetro Genesys 10 UV Scanning® (Thermo Scientific).

Reacción de PCR

Se ajustó la concentración de ADN de cada muestra a $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, cantidad suficiente para la amplificación de patrones tipo ISSR. Se usaron 21 iniciadores (Cuadro 27). Las reacciones de amplificación se realizaron en un volumen de 25 μL , que incluyó 3.2 μL de agua doble destilada estéril, 10 μL de dNTPs (500 μM), 2.5 μL de amortiguador 10X (Tris-HCl 50 mM, pH 8.8; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 200 mM; Tween 20 a 1 % (v/v)); 2.0 μL de MgCl_2 (25 μM); 3.0 μL de iniciador a una concentración de 10 pM; 0.3 μL de enzima Taq ADN polimerasa a una concentración de $5\text{U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$; y 4.0 μL de ADN genómico a una concentración de $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador Techne®28 TC-512.

Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial de 3 min a 94°C , desnaturalización a 94°C por un minuto, alineamiento a 50°C por un minuto, extensión a 72°C por 2 min y un paso de extensión final de 10 min a 72°C , con un total de 30 ciclos.

Cuadro 27. Iniciadores ISSR utilizados durante la caracterización molecular de accesiones cultivadas y silvestres de amaranto.

Iniciador ISSR	Secuencia
A3	5'-CTCCTCCTCCTCCTCCTC- 3'
A4	5'-CACACACACACACACAAG- 3'
A8	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGT- 3'
A10	5'-GAGAGAGAGAGAGAGA- 3'
P1	5'-GAGCAACAACAACAACAA- 3'
P2	5'-CTGAGAGAGAGAGAGAGAG- 3'
P3	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGTG- 3'
P5	5'-AGAGAGAGAGAGAGAG- 3'
RAH-04	5'-AAAGCTGCGG- 3'
IAH-01	5'-ACACACACACACA- 3'
IAH-02	5'-GTGTGTGTGTGTGG- 3'
IAH-03	5'-GAGAGAGAGAGACC- 3'
IAH-04	5'-CACCACCACGC- 3'
IAH-05	5'-GAGGAGGAGGC- 3'
ISSR 01	5'-AGGAGGAGGAGGAGGAGG- 3'
ISSR 03	5'-AGAGAGAGAGAGAGT- 3'
ISSR 04	5'-GAGAGAGAGAGAGAGAGAC- 3'
(AG) 8YA	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGYA- 3'
AG8C	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC- 3'
U873	5'-GACAGACAGACAGACA- 3'
U848	5'-CACACACACACACACARG

Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles de agarosa a una concentración de 1.2 % (p/v) con amortiguador TAE (40 mM Tris-acetato, pH 7.6; 1 mM Na₂ EDTA), por 1 h a 120 V. Para el corrimiento de las muestras se utilizaron 12 µL del producto de la reacción de PCR agregando 1 µL de amortiguador de carga (0.1 % azul de bromofenol, 0.1 % xylencianol, 30 % de

Ficoll y 1 % de SDS). Como referencia se utilizó el marcador 1kb ADN ladder plus (GeneRuler). Los geles se tiñeron con bromuro de etidio (0.5 mg.mL^{-1}) por 5 min, el exceso de colorante se eliminó enjuagando en agua 5 min y se documentaron con ayuda del equipo Kodak® High Performance Ultraviolet Transilluminator EDAS-290, bajo luz UV.

Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos durante la caracterización morfológica se registraron en formatos preestablecidos. Se registró información de diez plantas por accesión. Con dicha información se conformó una base de datos en hoja electrónica (Excel, 2013) y posteriormente se clasificaron las variables en cuantitativas y cualitativas para construir una Matriz Básica de Datos (MBD).

Los datos obtenidos durante la caracterización molecular se compararon con base en similitudes y diferencias en los patrones de bandeo, asignando un valor de 1 a la presencia de una banda y de 0 a la ausencia de la misma, asumiendo que bandas de igual peso molecular son idénticas entre individuos y especies, y se construyó también una Matriz Básica de Datos (MBD).

Empleando las MBD y mediante el programa NTSYS Versión 2.2 (Rohlf, 2000), se calcularon las matrices de similitud correspondientes, tanto para las matrices generadas por los marcadores morfológicos como la matriz generada por los marcadores moleculares se utilizó el coeficiente de concordancia simple (SM) (Sokal y Michener, 1958). Con las matrices resultantes se realizaron los análisis de conglomerados por el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method

Arithmetic Average; Sneath y Sokal, 1973) y se generaron los dendrogramas correspondientes. También, se realizó un análisis de escalado multidimensional no métrico mediante el programa NTSYS versión 2.1 (Rohlf, 2000).

Por último, se efectuaron pruebas de Mantel (Mantel, 1967) para determinar correlaciones entre las diferentes matrices de similitud, usando el programa NTSYS-pc Versión 2.1 (Rohlf, 2000).

RESULTADOS

Análisis de conglomerados y análisis de escalado multidimensional de marcadores morfológicos

Mediante el análisis de conglomerados de los marcadores morfológicos obtenidos usando los dos descriptores (UPOV e IBPGR) se generaron los dendrogramas con el coeficiente de concordancia simple (SM).

Caracterización morfológica usando descriptores del IBPGR

Caracterización usando características cualitativas

Con los datos cualitativos de los descriptores de IBPGR se obtuvo el dendrograma correspondiente a la Figura 23, donde se observa la formación de dos grandes grupos, mismos que se describen a continuación:

Grupo I: este grupo lo conformaron materiales cultivados de las especies *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*, además de una accesión de amaranto silvestre (47SPIN). Las accesiones THYP, NHYP y PHYP estuvieron muy

relacionadas entre sí, mientras que la accesión de *A. hypochondriacus* (RHYP) se relacionó más con el material de *A. spinosus* (47SPIN). Los materiales de *A. cruentus* se separaron claramente de los materiales de *A. hypochondriacus*, las accesiones 41CRU y 42CRU están morfológicamente más cercanas entre sí, al igual que las accesiones 78CRU y 92CRU.

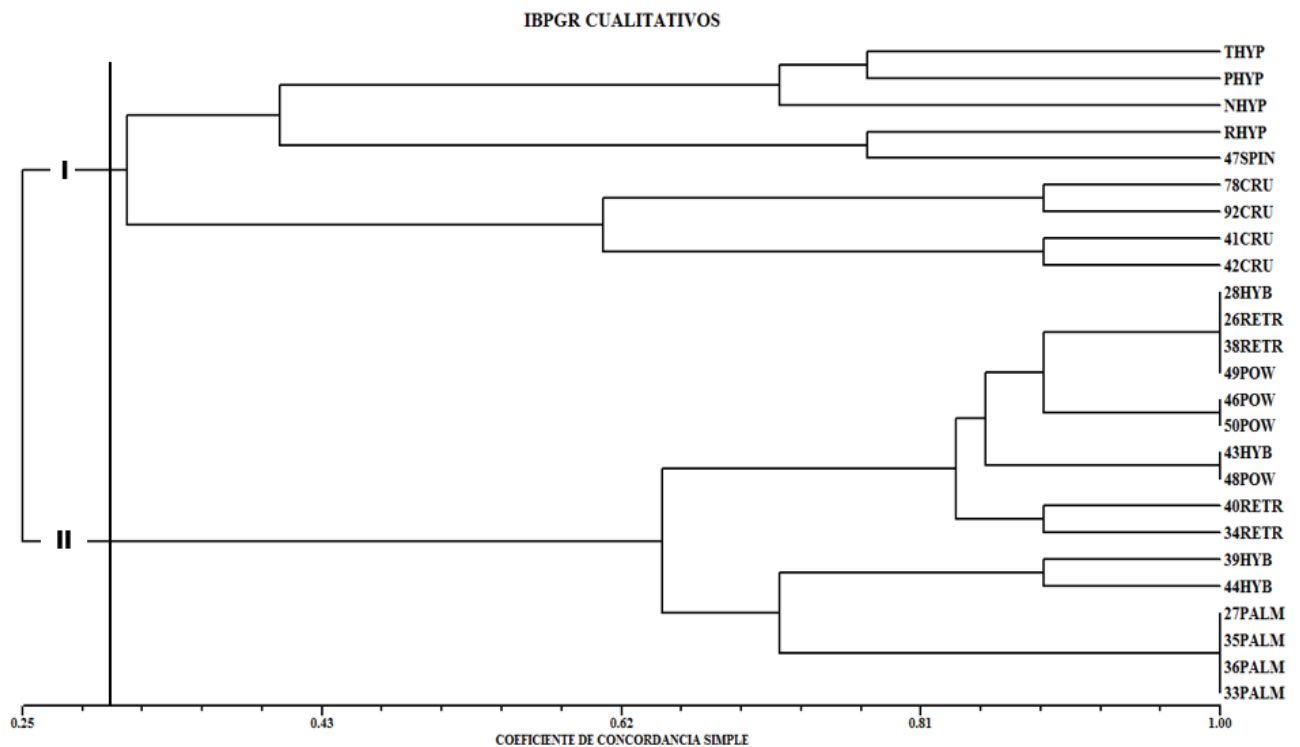


Figura 22. Dendrograma de relaciones entre accesiones de *Amaranthus*, obtenido con los datos de variables cualitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR.

Grupo II: este grupo se formó con todas las accesiones de materiales silvestres y mostró la formación de dos subgrupos. El primer subgrupo incluyó materiales de *A. hybridus*, *A. retroflexus* y *A. powellii*, en donde los

materiales de *A. powellii* (46POW, 50POW) fueron idénticos. Los materiales más alejados dentro de este subgrupo fueron de *A. retroflexus* (40RETR, 34RETR), que están muy relacionados. El segundo subgrupo se formó con todos los materiales de *A. palmeri* (27PALM, 35PALM, 36PALM, 33PALM), que mostraron ser morfológicamente iguales y tuvieron relación con los materiales de *A. hybridus* (39HYB, 44HYB).

Los resultados del análisis de escalado multidimensional de los datos cualitativos de los descriptores de IBPGR se presentan en las Figuras 24a y 24b con gráficos en 2 y 3 dimensiones. En el gráfico en 2D se observa la formación de cinco grupos, el grupo más grande lo conforman las especies silvestres *A. hybridus* (28HYB, 39HYB, 43HYB, 44HYB), *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW) y *A. retroflexus* (40RETR, 26RETR, 34RETR, 38RETR). El segundo grupo integró a las especies cultivadas *A. cruentus* (41CRU, 42CRU, 78CRU, 92CRU) y *A. hypochondriacus* (PHYP, THYP). Un tercer grupo pequeño incluyó a las accesiones de *A. palmeri* (27PALM, 33PALM, 35PALM, 36PALM) y *A. spinosus* (47SPIN), mientras que de manera individual se agrupan las accesiones de RHYP y NHYP de *A. hypochondriacus*.

En el gráfico en 3D se observa la formación de cuatro grupos. Un primer grupo se formó con la mayoría de los materiales silvestres de *A. hybridus* (28HYB, 39HYB, 43HYB, 44HYB), *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW) y *A. retroflexus* (40RETR, 26RETR, 34RETR, 38RETR). Un segundo grupo integró a los materiales de *A. hypochondriacus* (NHYP, PHYP, THYP) y *A. cruentus* (41CRU, 42CRU, 92CRU, 78CRU). El tercero incluyó a los amarantos de *A. palmeri*

(27PALM, 33PALM, 35PALM, 36PALM) y *A. spinosus* (47SPIN), mientras que RHYP de *A. hypochondriacus* agrupó de manera individual.

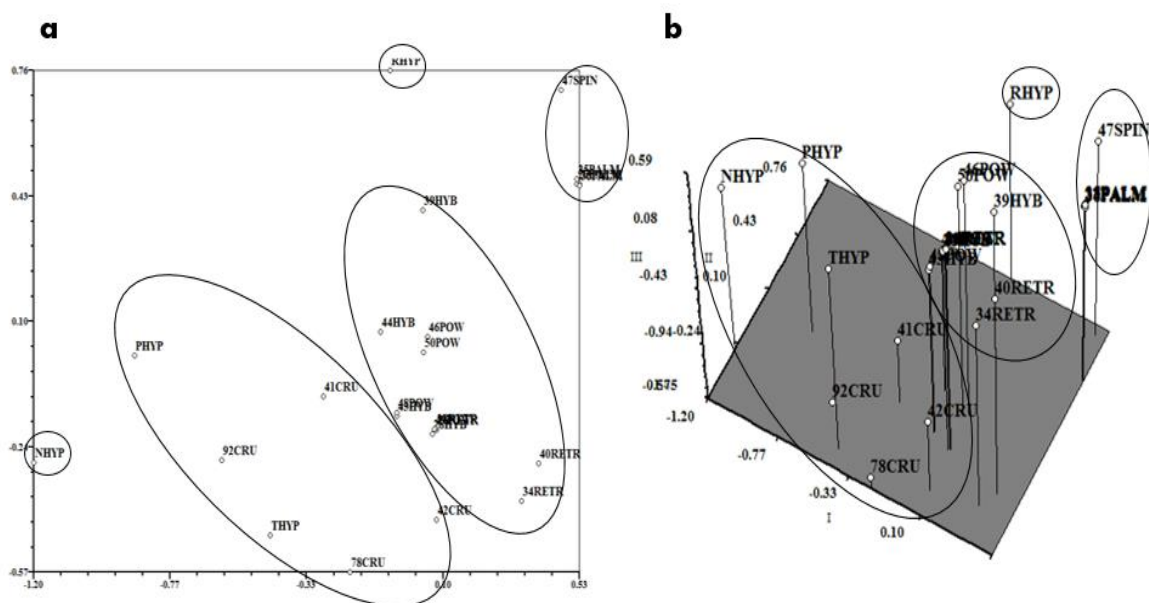


Figura 23. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.

Caracterización usando características cualitativas y cuantitativas

Con los datos cualitativos más cuantitativos de los descriptores de IBPGR se obtuvo el dendrograma correspondiente a la Figura 25, donde se observa la formación de dos grandes grupos, mismos que se describen a continuación:

Grupo I: incluyó a los materiales de las especies cultivadas *A. hypochondriacus* (THYP, PHYP, NHYP) y *A. cruentus* (78CRU, 92CRU, 41CRU, 42CRU), claramente diferenciados por especie y relacionados. La accesión RHYP de *A. hypochondriacus* mostró relación morfológica con la accesión 47SPIN de *A. spinosus*.

Grupo II: en este grupo se tuvo la formación de tres sub-grupos. En el primero se observó la asociación de materiales de *A. hybridus* (28HYB), *A. retroflexus* (26RETR, 38RETR, 34RETR) y *A. powellii* (49POW, 46POW, 50POW). En el segundo sub-grupo se incluyó a materiales de *A. hybridus* (39HYB, 44HYB, 43HYB) y *A. powellii* (48POW), y el tercer subgrupo integró a accesiones de *A. palmeri* (27PALM; 33PALM, 35PALM, 36PALM), donde esta especie fue la más alejada morfológicamente de entre las especies silvestres.

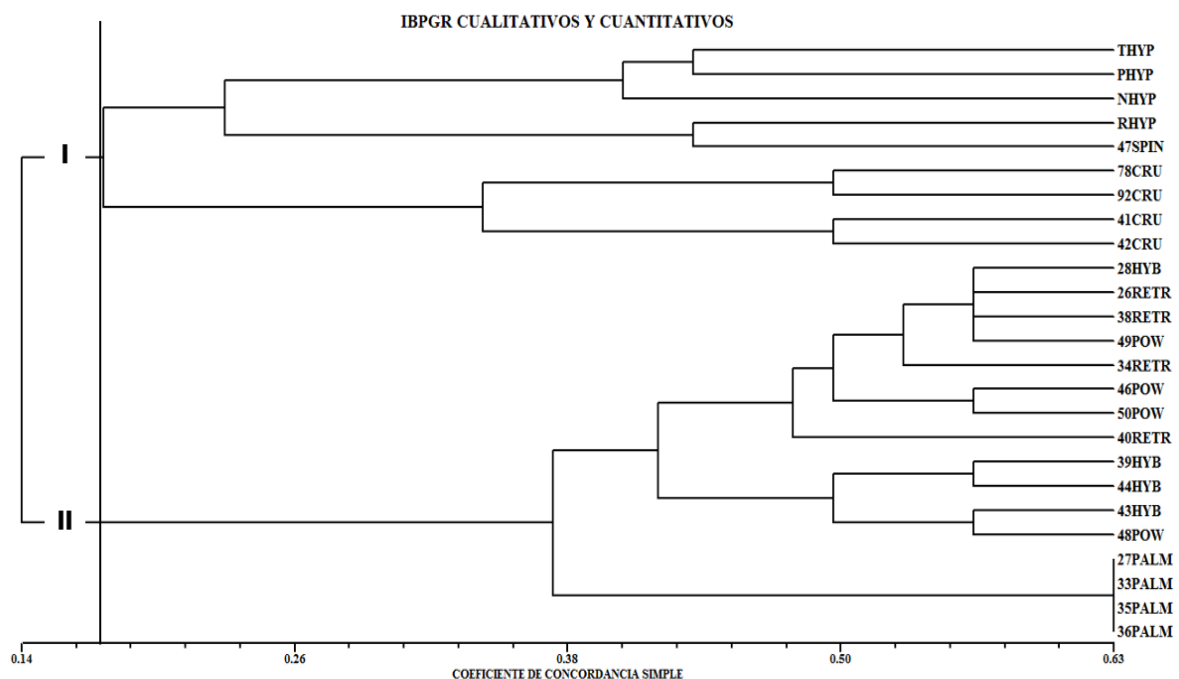


Figura 24. Dendrograma de relaciones entre accesiones de *Amaranthus*, obtenido con los datos de variables cualitativas y cuantitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR.

Los resultados del análisis de escalado multidimensional de los datos cualitativos más cuantitativos de los descriptores de IBPGR se presentan en las Figuras 26a y 26b mediante gráficos en 2 y 3 dimensiones, donde se observa la formación de cinco grupos. El primero se formó con las accesiones de *A. hypochondriacus* (NHYP, PHYP, THYP). El segundo grupo integró a los materiales de *A. cruentus* (41CRU, 42CRU, 92CRU, 78CRU).

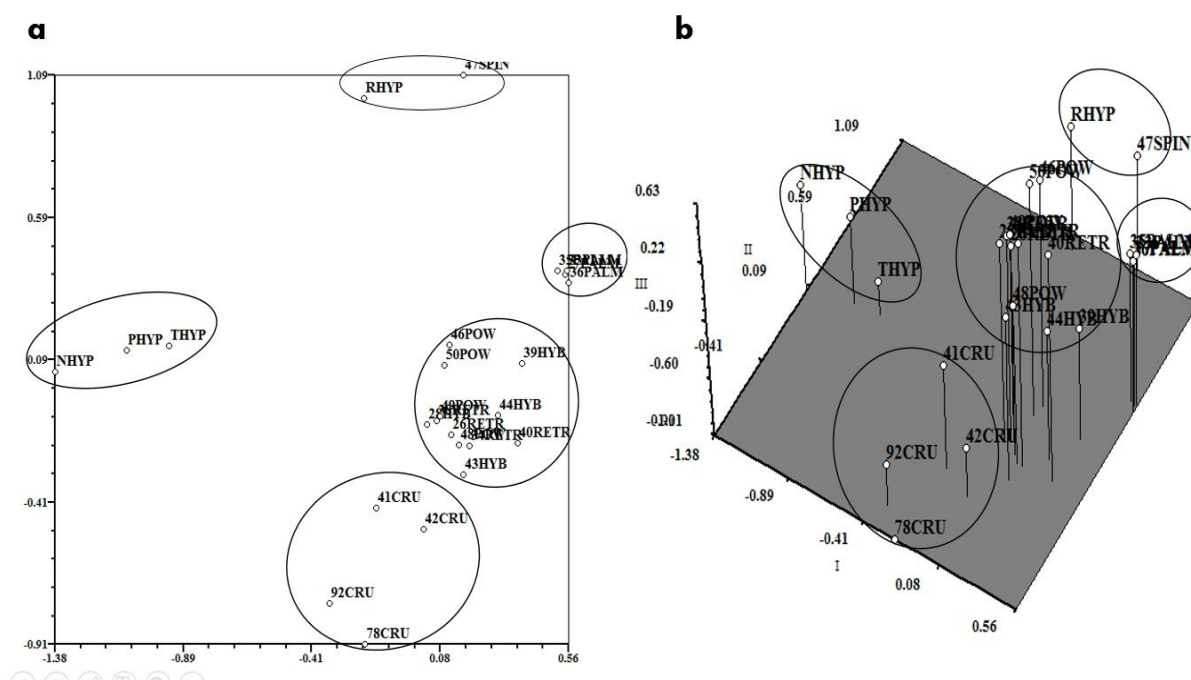


Figura 25. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas más cuantitativas correspondientes a los descriptores de IBPGR. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.

El tercer grupo incluyó a *A. palmeri* y el cuarto a los de *A. hypochondriacus* (RHYP) y *A. spinosus* (47SPIN), mientras que el quinto grupo y el más grande, estuvo conformado por los materiales silvestres de *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*.

Caracterización morfológica usando descriptores de UPOV

Caracterización usando características cualitativas

Con los datos de características cualitativas correspondientes a descriptores propuestos por UPOV se obtuvo el dendrograma mostrado en la Figura 27, donde se observa la formación de tres grupos, mismos que se describen a continuación:

Grupo I: incluyó a las accesiones de las especies cultivadas *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*. Se observa que los materiales correspondientes a cada especie están claramente diferenciados. La accesión THYP de *A. hypochondriacus* fue la más distante.

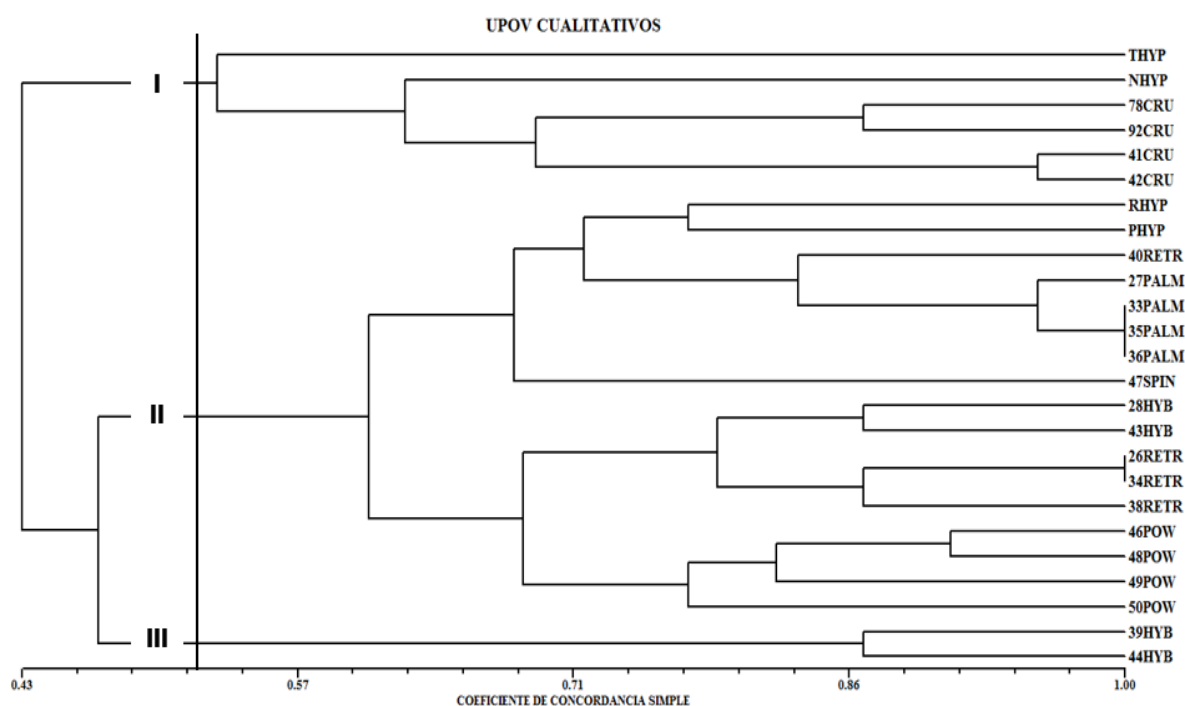


Figura 26. Dendrograma de relaciones entre accesiones de *Amaranthus*, obtenido con los datos de variables cualitativas correspondientes a los descriptores propuestos por UPOV.

Grupo II: en este grupo se formaron dos sub-grupos. El primer sub-grupo contiene materiales cultivados de *A. hypochondriacus* (RHYP, PHYP), accesiones silvestres de *A. palmeri* (27PALM, 33PALM, 35PALM, 36PALM), de *A. retroflexus* (40RETR) y de *A. spinosus* (47SPIN), que fue el material más alejado dentro de este sub-grupo. En el segundo sub-grupo se incluyeron materiales silvestres de *A. hybridus* (28HYB y 43HYB), de *A. retroflexus* (26RETR, 34RETR y 38RETR) y de *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW). En este subgrupo todas las especies están claramente diferenciadas.

Grupo III: incluyó a dos materiales de *A. hybridus* (39HYB, 44HYB) que mostraron ser morfológicamente similares.

Los resultados del análisis de escalado multidimensional de las variables cualitativas se muestran en las Figuras 28a y 28b en 2D y 3D, respectivamente. En el gráfico en 2D se observa la formación de tres grupos. En el primer grupo se incluyó a materiales de *A. palmeri* (33PALM), *A. powellii* (48POW), *A. retroflexus* (26RETR), *A. hybridus* (39HYB) y *A. cruentus* (92CRU). En un segundo grupo se integró a los materiales de *A. cruentus* (78CRU), *A. palmeri* (27PALM), *A. powellii* (46POW), *A. retroflexus* (40RETR), *A. hybridus* (28HYB) y *A. spinosus* (47SPIN) y por último en el tercer grupo se tuvo una aglomeración con los materiales restantes.

En el gráfico en 3D se muestra la formación de cuatro grupos, uno formado por *A. palmeri* (35PALM), *A. powellii* (49POW), *A. retroflexus* (34RETR), *A. hybridus* (43HYB) y *A. cruentus* (41CRU). En un segundo grupo se tiene a los materiales de

A. cruentus (78CRU), *A. palmeri* (27PALM), *A. powellii* (46POW), *A. retroflexus* (40RETR), *A. hybridus* (28HYB) y *A. spinosus* (47SPIN). En un tercer grupo se incluyó a *A. palmeri* (33PALM), *A. powellii* (48POW), *A. retroflexus* (26RETR) y *A. hybridus* (39HYB), y se observa un cuarto grupo formado por una aglomeración de los materiales restantes.

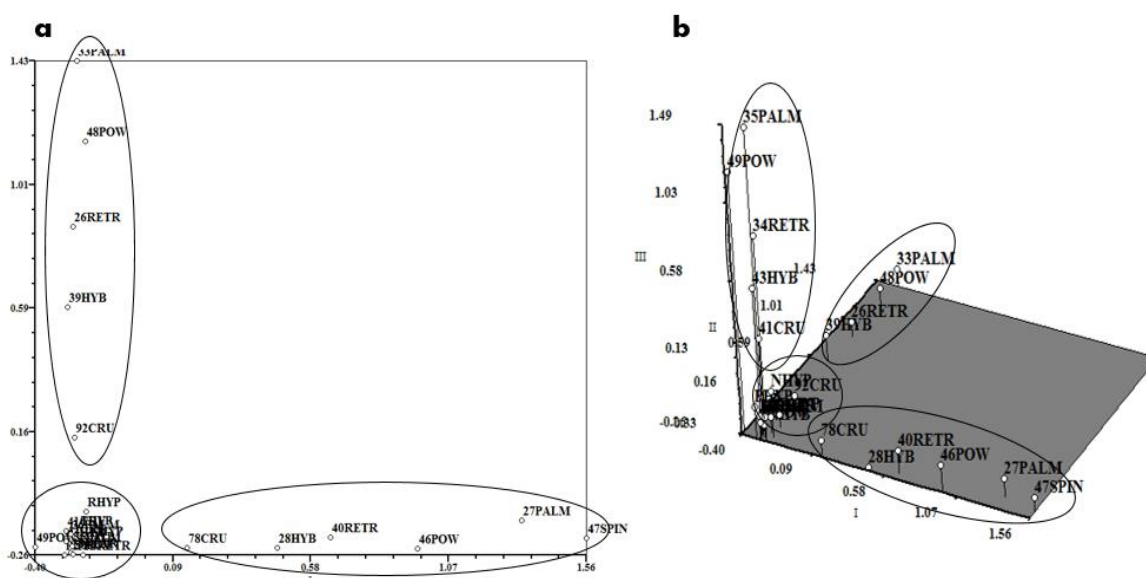


Figura 27. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas correspondientes a los descriptores de UPOV. A) Gráfico en 2D; B) gráfico en 3D.

Caracterización usando características cualitativas y cuantitativas

Con los datos de características cualitativas más cuantitativas correspondientes a descriptores propuestos por UPOV se obtuvo el dendrograma mostrado en la Figura 29, donde se observa la formación de tres grupos, mismos que se describen a continuación:

Grupo I: este grupo lo conformaron materiales cultivados. Se observa la asociación entre los materiales de *A. cruentus* (78CRU, 92CRU, 41CRU, 42CRU) con los de *A. hypochondriacus* (THYP, NHYP).

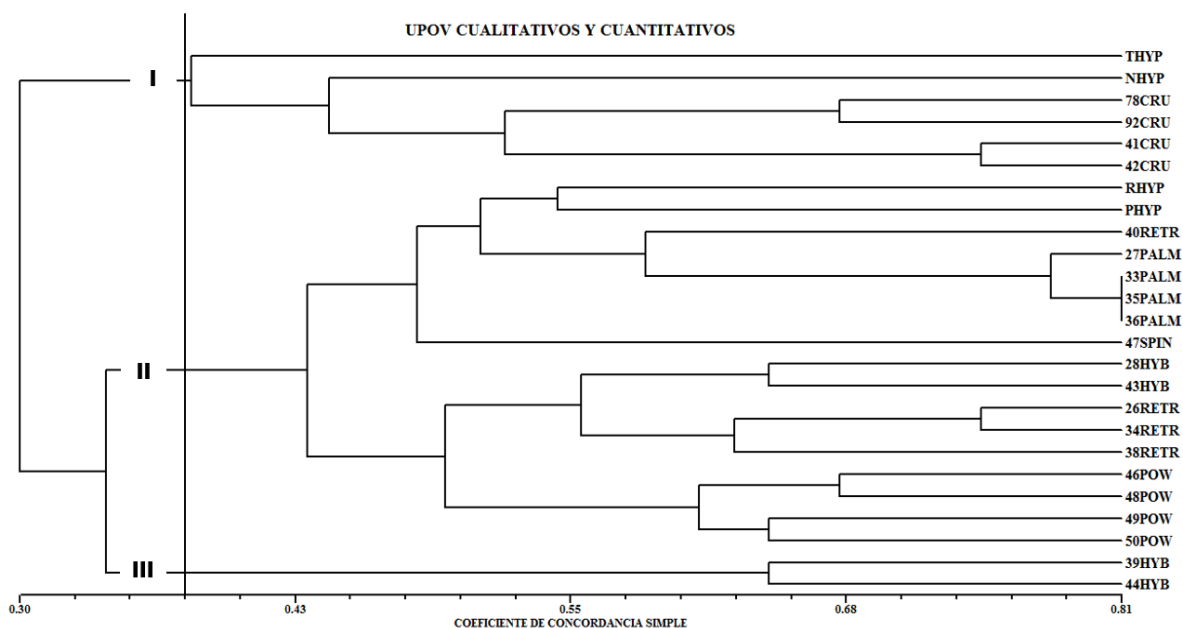


Figura 28. Dendrograma de relaciones entre accesiones de *Amaranthus*, obtenido con los datos de variables cualitativas más cuantitativas correspondientes a los descriptores propuestos por UPOV.

Grupo II: se observa la formación de dos sub-grupos. El primero incluye accesiones de *A. palmeri* (27PALM, 33PALM, 35PALM, 36PALM), de *A. retroflexus* (40RETR), de *A. hypochondriacus* (RHYP, PHYP) y *A. spinosus* (47SPIN), siendo éste último el material asociado más distante dentro de este sub-grupo. El segundo sub-grupo integró a *A. retroflexus* (26RETR, 34RETR, 38RETR) que estuvo relacionado con *A. hybridus* (28HYB, 43HYB).

43HYB), mientras que los más distantes dentro de este sub-grupo fueron los de *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW).

Grupo III: este grupo se formó con dos materiales de *A. hybridus* (39HYB, 44HYB).

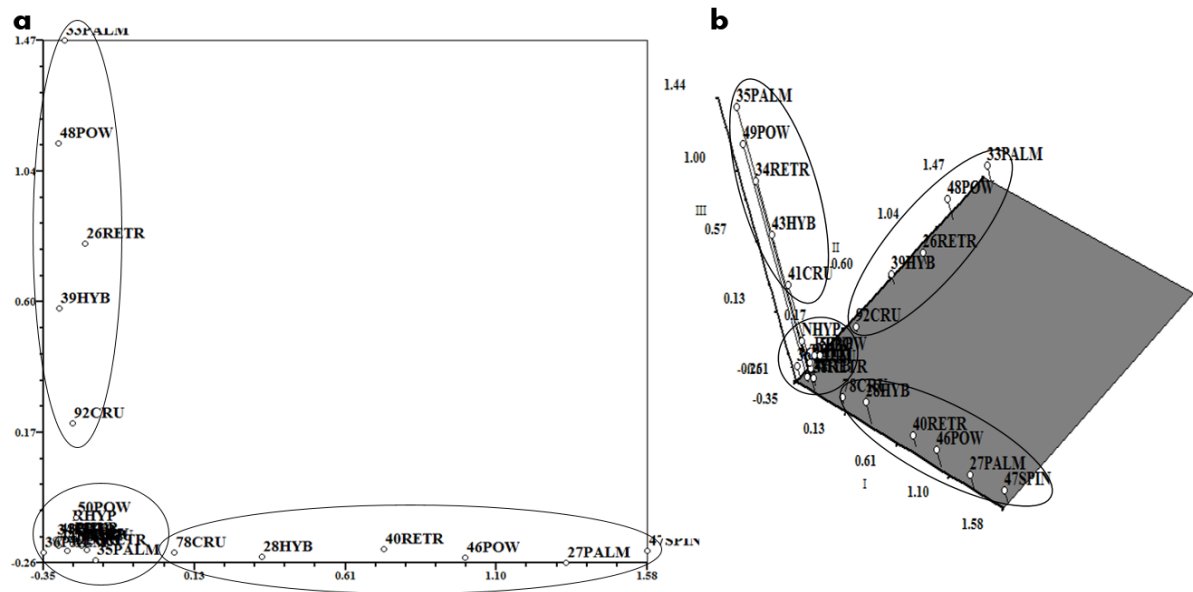


Figura 29. Escalado multidimensional de los datos de características cualitativas y cuantitativas correspondientes a los descriptores de UPOV. a) Gráfico en 2D; b) Gráfico en 3D.

Los resultados del análisis de escalado multidimensional de las variables cualitativas se muestran en las Figuras 30a y 30b en 2D y 3D. En la Figura en 2D se observa la formación de tres grupos. Uno incluyó a materiales de *A. palmeri* (33PALM), *A. powellii* (48POW), *A. retroflexus* (26RETR), *A. hybridus* (39HYB) y *A. cruentus* (92CRU). Otro integró a *A. spinosus* (47SPIN), *A. palmeri* (27PALM), *A. powellii* (46POW), *A. retroflexus* (40RETR), *A. hybridus* (28HYB) y *A. cruentus*

(78CRU), y un último grupo muestra una aglomeración del resto de materiales en estudio.

En el gráfico en 3D se tuvo la formación de cuatro grupos: un grupo formado por las especies *A. palmeri* (35PALM), *A. powellii* (49POW), *A. retroflexus* (34RETR), *A. hybridus* (43HYB) y *A. cruentus* (41CRU); un segundo grupo integrado por *A. palmeri* (33PALM), *A. powellii* (48POW), *A. retroflexus* (326RETR), *A. hybridus* (39HYB) y *A. cruentus* (92CRU); un tercer grupo con *A. spinosus* (47SPIN), *A. palmeri* (27PALM), *A. powellii* (46POW), *A. retroflexus* (40RETR), *A. hybridus* (28HYB) y *A. cruentus* (78CRU), y un conglomerado central con el resto de los materiales en estudio.

Caracterización molecular

Se evaluó un total de 334 *loci* de los que 327 mostraron polimorfismo. El dendrograma de relaciones genéticas entre las accesiones de amaranto pertenecientes a diferentes especies del género *Amaranthus* (Figura 31), permite observar la formación de cinco grupos a un coeficiente de concordancia simple (SM) igual a 0.75.

Grupo I: se formó con accesiones de las especies cultivadas. Este grupo se divide en dos subgrupos, uno integrado por las accesiones de la especie *hypochondriacus* (PHYP, NHYP, RHYP y THYP) y el segundo formado con las accesiones de la especie *cruentus* (92CRU, 78CRU, 41CRU y 42CRU).

Grupo II: se formó con materiales silvestres y se divide en dos subgrupos, el primero integrado por materiales de la especie *hybridus* (44HYB, 43HYB, 39HYB y 28HYB), que estuvieron relacionados con accesiones de la

especie *retroflexus* (34RETR, 26RETR) y *powellii* (50POW), donde el material más alejado dentro de este sub-grupo fue uno de *A. retroflexus* (38RETR). El segundo subgrupo incluyó a genotipos de *A. powellii* (49POW, 48POW, 46POW).

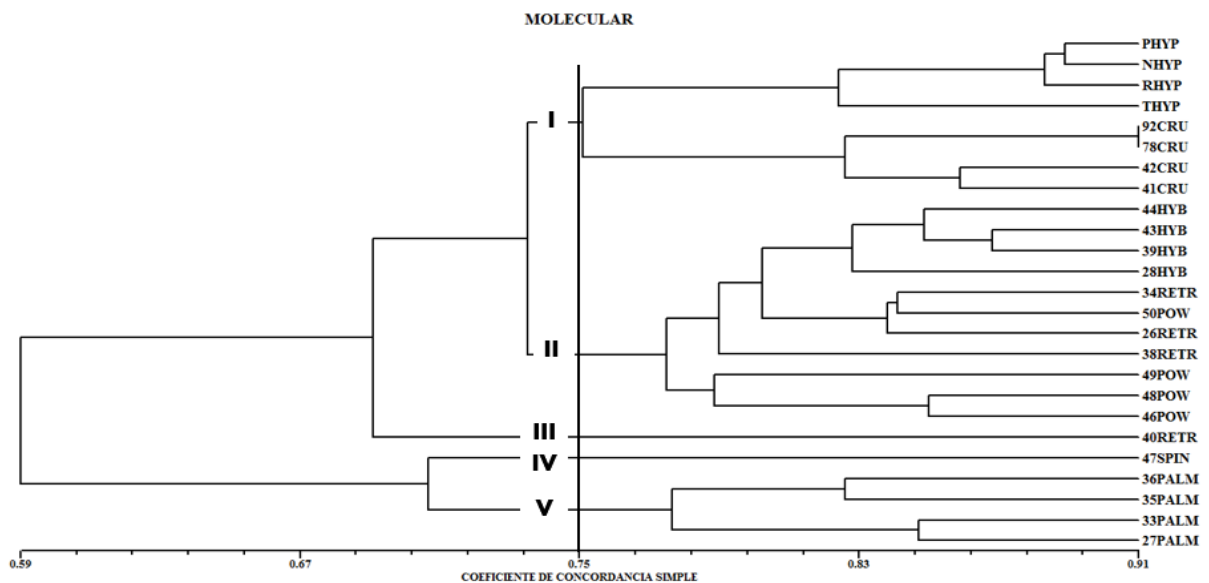


Figura 30. Dendrograma de relaciones genéticas entre accesiones de *Amaranthus* obtenido usando marcadores moleculares tipo ISSR.

Grupo III: lo formó una accesión de *A. retroflexus* (40RETR).

Grupo IV: incluyó a una accesión de *A. spinosus* (47SPIN).

Grupo V: lo integraron todos los materiales de *A. palmeri* (36PALM, 35PALM, 33PALM y 27PALM) (Figura 31).

Del análisis de escalado multidimensional de los datos moleculares se obtuvieron gráficos en 2D (Figura 32a) y 3D (Figura 33), donde se muestra la agrupación de los materiales en estudio. Se observa asociación entre los materiales de *A.*

hypochondriacus (THYP, RHYP, NHYP, PHYP), *A. cruentus* (78CRU, 92CRU, 41CRU, 42CRU), *A. hybridus* (28HYB, 39HYB, 43HYB, 44HYB), *A. retroflexus* (40RETR, 26RETR, 34RETR, 38RETR) y *A. powellii* (46POW, 48POW, 49POW, 50POW), mientras que los materiales de *A. palmeri* (27PALM, 33PALM, 35PALM, 36PALM) y *A. spinosus* (47SPIN) agruparon de manera distante en relación a los demás materiales en estudio.

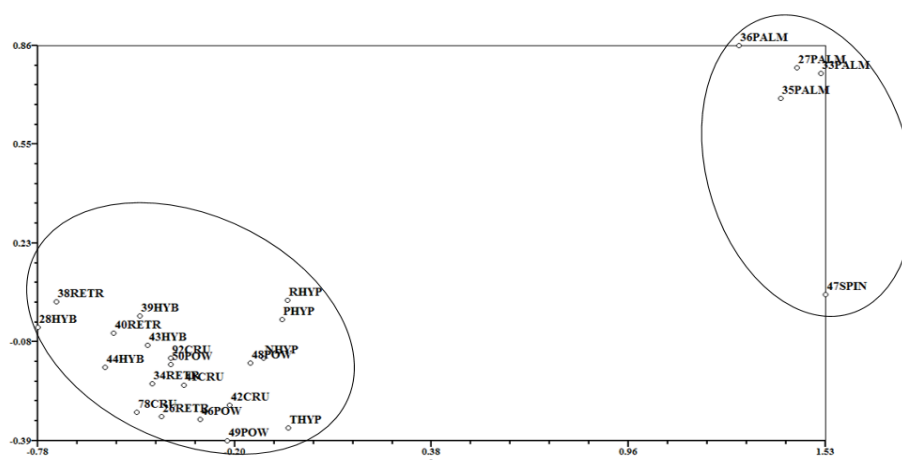


Figura 31. Escalado multidimensional obtenido a partir de datos de marcadores moleculares tipo ISSR. Gráfico en 2D.

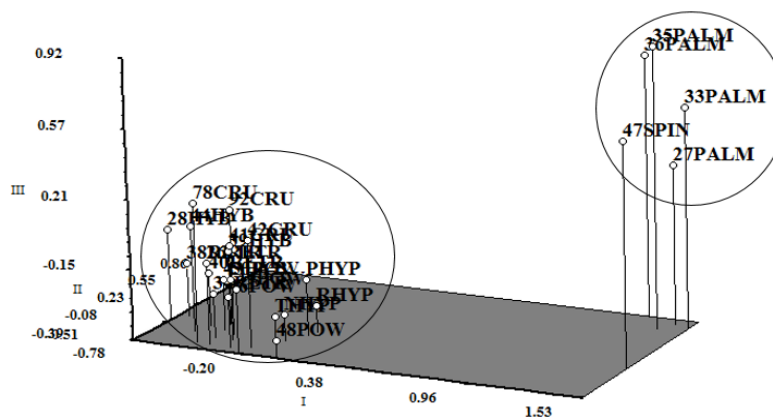


Figura 32. Escalado multidimensional obtenido a partir de datos de marcadores moleculares tipo ISSR. Gráfico en 3D.

Caracterización Morfológica vs Molecular

Se realizaron pruebas de Mantel para determinar el valor de correlación existente entre las diferentes matrices obtenidas para los diferentes tipos de marcadores evaluados en este trabajo (marcadores morfológicos y marcadores moleculares) y todas sus combinaciones posibles (Cuadro 28).

Cuadro 28. Valores de correlación de Mantel obtenidos al comparar matrices generadas con diferentes tipos de marcadores.

MARCADOR		MARCADOR	CORRELACIÓN DE MANTEL	
UPOV cuantitativos	VS	UPOV cualitativos	0.44532	**
IBPGR cuantitativos	VS	IBPGR cualitativos	0.32643	**
UPOV cuantitativos	VS	IBPGR cuantitativos	0.71415	**
UPOV cuantitativos	VS	IBPGR cualitativos	0.45982	**
UPOV cualitativos	VS	IBPGR cuantitativos	0.19791	**
UPOV cualitativos	VS	IBPGR cualitativos	0.63576	**
UPOV cuanti+cuali	VS	IBPGR cuanti+cuali	0.66005	**
UPOV cuanti+cuali	VS	IBPGR cualitativos	0.65577	**
UPOV cuanti+cuali	VS	IBPGR cuantitativos	0.28567	**
UPOV cuanti+cuali	VS	UPOV cualitativos	0.99179	**
UPOV cuanti+cuali	VS	UPOV cuantitativos	0.55613	**
IBPGR cuanti+cuali	VS	UPOV cualitativos	0.63161	**
IBPGR cuanti+cuali	VS	UPOV cuantitativos	0.51674	**
IBPGR cuanti+cuali	VS	IBPGR cuantitativos	0.41856	**
IBPGR cuanti+cuali	VS	IBPGR cualitativos	0.99507	**
Molecular	VS	UPOV cuantitativos	0.19332	**
Molecular	VS	UPOV cualitativos	-0.00981	NS
Molecular	VS	UPOV cuanti+cuali	0.01849	NS
Molecular	VS	IBPGR cuantitativos	-0.05044	NS
Molecular	VS	IBPGR cualitativos	0.23152	**
Molecular	VS	IBPGR cuanti+cuali	0.21716	**

** Significancia 0.01; NA: no significativo

Los valores de correlación más altos se obtuvieron entre las matrices generadas con datos morfológicos. Las matrices generadas con datos de características cualitativas de descriptores de UPOV vs matriz generada con datos de características cualitativas y cuantitativas de descriptores de UPOV tuvieron un valor de correlación de 0.99179 (Cuadro 28, Figura 34b), mientras que otro valor alto se obtuvo con las matrices generadas con datos de características cualitativas de descriptores de IBPGR vs matriz generada con datos de características cualitativas y cuantitativas de descriptor de IBPGR que tuvo un valor de correlación de 0.99507 (Cuadro 28, Figura 34a), estos valores son altos debido a que ambas matrices comparadas comparten variables cualitativas.

Entre matrices de descriptores morfológicos de UPOV vs IBPGR hubo valores de correlación intermedios cuando estos fueron del mismo tipo, por ejemplo la comparación de UPOV cuantitativos vs IBPGR cuantitativos dio un valor de 0.71415 y la comparación de UPOV cualitativos vs IBPGR cualitativos arrojó un valor de correlación igual a 0.63576 (Cuadro 28).

Cuando se comparó matrices generadas con marcadores morfológicos de cualquier tipo contra la matriz de marcadores moleculares los valores de correlación fueron bajos o negativos (Cuadro 28), lo que sugiere que los diferentes tipos de marcadores evalúan *loci* diferentes y están nada o poco relacionados, lo que también se refleja en agrupaciones un tanto diferentes. Los morfológicos evalúan a nivel fenotípico y los moleculares a nivel genotípico, lo que implica que existan materiales fenotípicamente iguales, pero genéticamente diferentes.

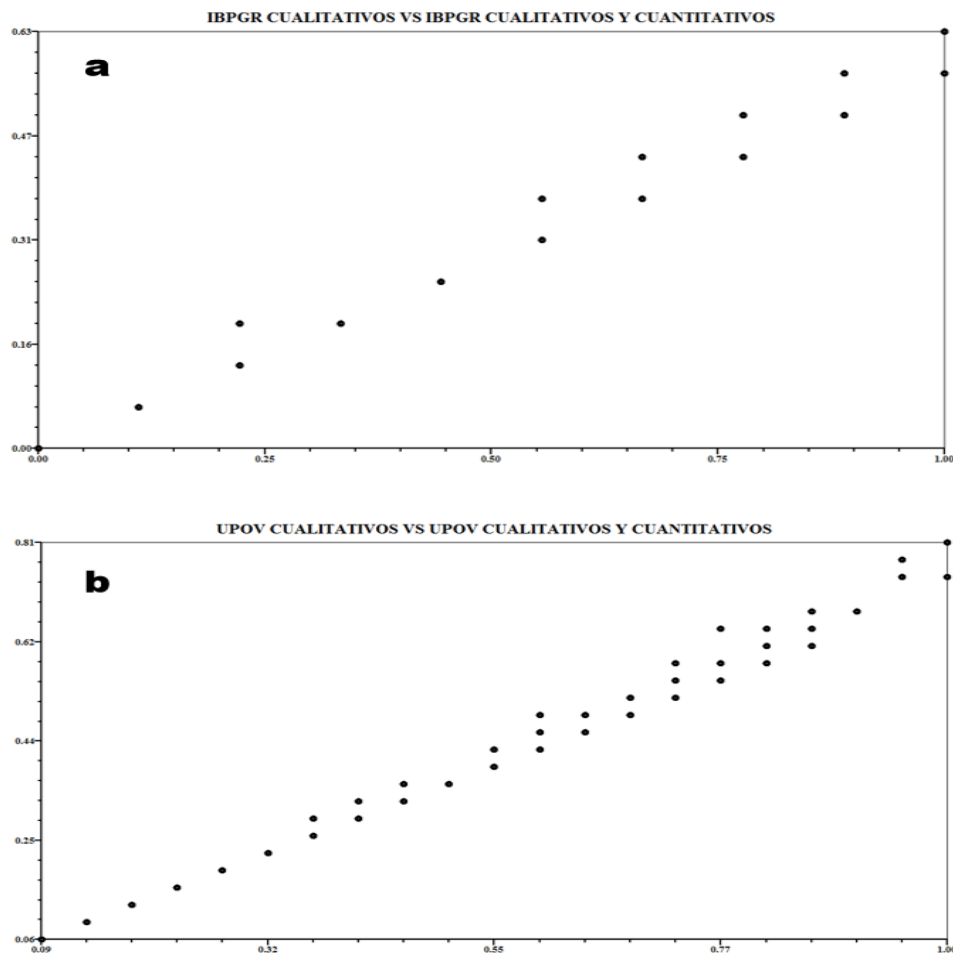


Figura 33. Correlación entre las matrices obtenidas con combinaciones de marcadores: a) IBPGR cualitativos vs IBPGR cualitativos más cuantitativos; b) UPOV cualitativos vs UPOV cualitativos más cuantitativos.

DISCUSIÓN

La caracterización morfológica del género *Amaranthus* es difícil porque muestra una amplia diversidad entre e incluso dentro de ciertas especies (Snezana *et al.*, 2012; Htet y Park, 2013), pero sobre todo debido a la alta plasticidad del género que le permite adaptarse a diferentes zonas o regiones de diferentes países, lo

que conlleva a que su morfología sea variable para una misma población. La expresión de rasgos cuantitativos se ve influenciada por el ambiente y el patrón de variación en estos rasgos se considera generalmente que es el resultado de ambos atributos: genéticos y ambientales (Espitia, 1986; Sammour *et al.*, 2012; Mwase *et al.*, 2014).

Wu *et al.* (2000) y Rivelli *et al.* (2008) mencionan que la gran variabilidad en los resultados de las caracterizaciones morfológicas se debe principalmente al origen de los materiales evaluados y la enorme variación morfológica y genética que presenta el género *Amaranthus*, así como a la sensibilidad a la luz de algunos materiales. Al respecto, Guillen *et al.* (1999) demostraron que las condiciones ambientales afectan la expresión de rasgos morfológicos y agronómicos en una población que presenta un pequeño grado de variabilidad genética, mientras que Oboh (2007) y Akeneme y Ani (2013) reportan que dentro de las accesiones de *A. hybridus* se puede encontrar variaciones en muchos rasgos, lo que representa una gran diversidad morfológica interna de la especie.

Por dichas razones Costea *et al.* (2006) mencionan que aunque los criterios morfológicos básicos pueden aplicarse a los especímenes de herbario o colecciones de germoplasma para la identificación taxonómica rápida, los datos morfológicos por sí solos pueden ser engañosos y deben acompañarse de caracterizaciones moleculares.

En el presente trabajo se detectó la existencia de amplia variabilidad morfológica dentro del género *Amaranthus*. Estos resultados coinciden con los reportados por Wu *et al.* (2000), Joshi *et al.* (2011) y Ruiz (2013), que también identificaron varios

genotipos que parecían tener características agronómicas favorables de uso inmediato para el desarrollo de cultivares mejorados. Ruiz *et al.* (2013) menciona la gran diversidad de formas y colores entre especies y razas del género *Amaranthus* y reporta que las poblaciones cultivadas de *Amaranthus* (*A. hypochondriacus* L., *A. cruentus* L. y *A. caudatus* L.) están morfológicamente relacionadas, mientras que Erum *et al.* (2012) indican la agrupación entre materiales de *A. hypochondriacus* y su clara separación con *A. tricolor*.

Los estudios moleculares de diversidad genética entre las especies de amaranto de grano cultivadas han demostrado mayor grado de similitud genética entre *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, mientras que la más alejada es *A. cruentus* (Transue *et al.*, 1994; Chan and Sun, 1997; Mandal y Das, 2002). Al respecto, Legaria (2010) encuentra mayor relación entre *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* a un coeficiente de identidad de Nei's de 0.45, esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente trabajo donde los amarantos de grano cultivados (*A. hypochondriacus* y *A. cruentus*) agrupan juntos y se separan claramente de los amarantos silvestres.

En estudios comparativos de especies cultivadas y silvestres se ha reportado mayor similitud entre las especies cultivadas que entre las silvestres. El caso contrario lo reportan Ray y Roy (2008) y Štefúnová *et al.* (2014), quienes indican asociación más cercana entre *A. cruentus* y *A. caudatus*, mientras que *A. hypochondriacus* se encuentra alejada de estas dos especies.

Popa (2010) encuentra que *A. hypochondriacus* y *A. cruentus* están muy relacionados, mostrando una distancia mínima entre ellos del 18 al 20 %, mientras

A. powellii, una especie silvestre se relaciona muy distante. También, Ranade *et al.* (1997), reportan una agrupación distante entre *A. spinosus* y *A. lividus* respecto a *A. hypochondriacus* y *A. hybridus*, encontrándose éstos últimos genéticamente más relacionados. La cercanía genética que se da entre los materiales de grano cultivados y *A. hybridus* es apoyada por una hipótesis establecida por varios autores (Ranade *et al.*, 1997; Mandal y Das, 2002; Ray y Roy, 2008; Mallory *et al.*, 2008; Maughan *et al.*, 2011), quienes sugieren un origen monofilético para los materiales cultivados. Al respecto, Chan y Sun (1997), plantean que los amarantos de grano cultivados deben tener solamente un progenitor y éste es *A. hybridus*.

Por otro lado, Pal y Khoshoo (1982) reportan asociación entre los amarantos cultivados y amarantos silvestres como *A. hybridus* L., *A. quitensis* Kunth, y *A. powellii* S. Watson y sugieren que éstos últimos pudieran ser los progenitores de los primeros. Es posible que por esta razón en el presente trabajo los amarantos silvestres *A. hybridus*, *A. powellii* y *A. retroflexus*, estén agrupando con los amarantos de grano cultivados *A. hypochondriacus* y *A. cruentus*.

La baja correlación entre los marcadores morfológicos y moleculares puede deberse al hecho de que una gran porción de variación detectada por los marcadores moleculares es no-adaptativa y por tanto no está sujeta a la selección natural o artificial como sucede con los caracteres fenotípicos, que en adición a la presión de selección también son influenciados por el ambiente (Vieira *et al.*, 2007). Onamu *et al.* (2012) al realizar la prueba de Mantel reportan una baja correlación entre caracteres cualitativos y cuantitativos del cultivo de papa, esto quedó demostrado por el hecho de que cultivares diferentes fueron asignados a

grupos diferentes al usar uno u otro tipo de marcador, esto coincide con nuestros resultados donde con diferente marcador se genera diferentes agrupaciones. También, Bautista *et al.* (2011) encuentran niveles bajos de correlación ($r=-0.126$) entre los marcadores morfológicos y moleculares para lirio. Por su parte Tapia *et al.* (2005) establecen que los agrupamientos de piña generados tanto por ISSR como por RAPD fueron similares, pero que difirieron con el obtenido mediante datos morfológicos. Costea *et al.* (2006) mencionan que los marcadores del tipo AFLP se utilizaron con éxito para determinar las especies de amaranto pero también difieren al nivel morfológico. Por esta razón tanto Snezana *et al.* (2012) como Mwase *et al.* (2014) indican que prefieren el uso de marcadores moleculares para identificar la variabilidad genética, debido a que estos marcadores no se ven influenciados por efectos ambientales.

La caracterización amplia de especies locales e introducidas es una herramienta poderosa e importante para identificar caracteres de gran importancia agronómica para el desarrollo de cultivares (Kauffman y Reider, 1986).

CONCLUSIONES

Las variables morfológicas cuantitativas estudiadas presentaron variación continua, lo que significa que son características determinadas por poli genes e interaccionan con el ambiente. Los resultados de la prueba de Mantel para asociación entre las matrices derivadas de datos moleculares y morfológicos indicó correlaciones muy bajas y positivas entre marcadores morfológicos cuantitativos vs cualitativos y valores muy bajos y negativos entre marcadores

morfológicos vs moleculares, mostrando que los tipos de marcadores evalúan *loci* no relacionados y discriminan de manera muy diferente entre los genotipos. Los caracteres morfológicos al ser influenciados por el ambiente pueden generar resultados ambiguos, por esta razón las caracterizaciones se deben realizar utilizando tanto marcadores morfológicos como moleculares.

BIBLIOGRAFÍA

- Akaneme, F. I. and Ani, G. O. 2013. Morphological Assessment of Genetic Variability among Accessions of *Amaranthus hybridus*. World Applied Sciences Journal 28(4):568-577.
- Bautista P., M.; Vázquez G., D.; Leszczynska B., L. M.; Borysy, H.; Michal, W. y Arzate F, A. M. 2011. Caracterización del lirio azteca mediante marcadores morfológicos y moleculares. Agrociencia 45(4):413-422.
- Becerra, V. y Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura Técnica 60(3):270-281.
- Chan, K. F. and Sun, M. 1997. Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. Theoretical and Applied Genetics 95:865-873.
- Costea, M.; Brenner, D. M.; Tardif, F. J.; Tan, Y. F. and Sun, M. 2006. Delimitation of *Amaranthus cruentus* L. and *Amaranthus caudatus* L. using micromorphology and AFLP analysis: an application in germplasm identification. Genetic Resources and Crop Evolution 53(8):1625-1633.

- Erum, S.; Naeemullah, M.; Masood, S.; Qayyum, A. and Rabbani, M. A. 2012. Genetic divergence in *Amaranthus* collected from Pakistan. The Journal of Animal & Plant Sciences 22(3):653-658.
- Espitia R., E. 1986. Caracterización y evaluación preliminar de germoplasma de *Amaranthus spp.* Tesis de Licenciatura. UAAN. Saltillo, Coahuila, México. 105 p.
- Guillen P., F. R.; Baltensperger, D. D.; Nelson, L. A. and D'Croz M, N. 1999. Variability in Plainsman grain amaranth. *In: Perspectives on new crops and new uses.* J. Janick (ed.). ASHS Press. Alexandria, VA. pp: 184-189.
- Hamrick, J. and Godt, H. 1996. Conservation genetics of endemic plant species. *In: Conservation genetics: case histories from nature.* Avise, J. C. and Hamrick, J. L. (eds.). Chapman and Hall. New York. pp: 281-304.
- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad Genética y Caracterización de Especies Vegetales. *In: Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Fitogenéticos.* Franco, T. L. e Hidalgo, R. (eds.). Boletín Técnico No. 8. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos (IPGRI). Cali, Colombia. pp: 2-26.
- Htet, O. W. and Park, Y. J. 2013. Analysis of the Genetic Diversity and Population Structure of Amaranth from South America Using 14 SSR Markers. Korean Journal of Crop Science 58(4):336-346.
- Jaccard, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florale. Bulletin de la Société Vaudoise de Science Nature 44:223-70.

- Joshi, V.; Vijaya, M.; Sireesha, K. and Madhavi L., P. 2011. Characterization and preliminary evaluation of Vegetable amaranth (*Amaranthus* spp.). *Vegetable Science* 38(2):239-240.
- Kauffman, C. S. and Reider, C. 1986. Amaranth germoplasm collection. Rodale Press Inc. Emmaus. P. A. 114 p.
- Legaria S., J. P. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). *Revista Fitotecnia Mexicana* 33(2):89-95.
- Mallory, M. A.; Hall, R. V.; McNabb, A. R.; Pratt, D. B.; Jellen, E. N. and Maughan, P. J. 2008. Development and characterization of microsatellite markers for the grain amaranths. *Crop Science* 48:1098–1106.
- Mandal, N. y Das P. K. 2002. Intra- and interspecific genetic diversity in grain *Amaranthus* using Random Amplified Polymorphic DNA markers. *Plant Tissue Culture* 12(1):49-56.
- Mantel, N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research* 27:209–220.
- Maughan, P. J.; Smith, S. M.; Fairbanks, D. J. and Jellen, E. N. 2011. Development, Characterization, and Linkage Mapping of Single Nucleotide Polymorphisms in the Grain Amaranths (*Amaranthus* sp.). *Plant Genome* 4(1):92-101.
- Mwase, W. F.; Kachiguma, N.; Manduwa, D. and Maliro, M. F. A. 2014. Agromorphological diversity of *Amaranthus* species in Central Malawi. *International Journal of AgriScience* 4(4):235-241.

- Oboh, B. 2007. Multivariate analysis of the diversity among some Nigerian accessions of *Amaranthus hybridus*. International Journal of Plant Breeding and Genetics 1(2):89-94.
- Onamu, R.; Legaria S., J. P.; Sahagún C., J.; Rodríguez De la O., J. L. y Perez N., J. 2012. Análisis de marcadores morfológicos y moleculares en papa. Revista Fitotecnia Mexicana 35(4):267-277.
- Pal, M. and Khoshoo. T. N. 1972. Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. Journal of Heredity 63:78–82.
- Popa, G.; Cornea, C. P.; Ciuca, M.; Babeanu, N.; Popa, O. and Marin, D. 2010. Studies On Genetic Diversity In *Amaranthus* Species Using The RAPD Markers. Analele Universităţii din Oradea–Fascicula Biologie 17(2):280-285.
- Ranade, S. A.; Kumar, A.; Goswami, M.; Farooqui, N. and Sane, P.V. 1997. Genome analysis of amaranths: Determination of inter and intra species variations. Journal of Biosciences 22(4):457-464.
- Rao, N. K. 2004. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology. African Journal of Biotechnology 3:136-145.
- Ray, T. and Roy, S.C. 2008. Genetic diversity of *Amaranthus* species from the Indo-Gangetic plains revealed by RAPD analysis leading to the development of ecotype-specific SCAR marker. Oxford Journals 100(3):338-347.
- Rivelli, A. R.; Gherbin, P.; De M, S. and Pizza, S. 2008. Field Evaluation of *Amaranthus* Species for Seed and Biomass Yields in Southern Italy. The Italian Journal of Agronomy / Rivista di Agronomia 3:225-229.

- Rohlf, F. J. 2000. Programme NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system: version 2.1. Exeter Software. NewYork. 38 p.
- Ruiz H., V. C.; De la O O., M.; Espitia R., E.; Sangerman J., D. M.; Hernández C., J. M. y Schwentesius R., R. 2013. Variabilidad cualitativa y cuantitativa de accesiones de amaranto determinada mediante caracterización morfológica. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 4(5):789-801.
- Sammour, R. H.; Radwan, S. A. and Mira, M. 2012. Genetic diversity in genus *Amaranthus*: From morphology to genomic DNA. *Research & Reviews in BioSciences* 6(11):351-360.
- Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. 1973. Numerical Taxonomy: the principles and practice of numerical classification. W. H. Freeman y Co. 573p.
- Snezana, D. M.; Marija, K.; Danijela, R.; Milena, S. and Lidija, S. 2012. Assessment of genetic relatedness of the two *Amaranthus retroflexus* populations by protein and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *African Journal of Biotechnology* 11(29):7331-7337.
- Sokal, R. R. and Michener, C. D. 1958. "A Statistical Method for Evaluating Systematic Relationships". *University of Kansas Scientific Bulletin* 38:1409–1438.
- Štefúnová, V.; Bežo, M.; Labajová, M. and Senková, S. 2014. Genetic analysis of three *Amaranth* species using ISSR markers. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 26(1):35-43.
- Tapia C., E.; Guillén A., H. y Gutiérrez E., M. A. 2005. Caracterización genética de materiales de piña (*Ananas spp.*) mediante RAPD e ISSR. *Revista Fitotecnia Mexicana* 28(3):187–194.

- Transue, D. K.; Fairbanks, D. J.; Robison, L. R. and Andersen, W. R. 1994. Species identification by RAPD analysis of grain Amaranth genetic resources. *Crop Science* 34(5):1385-1389.
- Vieira, E.; Carvalho, F.; Bertan, I.; Kopp, M.; Zimmer, P.; Benin, G.; Da Silva, J.; Hartwig, I.; Malone, G. and De Oliveira, A. 2007. Association between genetic distances in wheat (*Triticum aestivum* L.) as estimated by AFLP and morphological markers. *Genetics and Molecular Biology* 30:392–399.
- Wu, H. X.; Sun, M.; Yue, S. X.; Sun, H. L.; Cai, Y. Z.; Huang, R. H.; Brenner, D. and Corke, H. 2000. Field evaluation of an *Amaranthus* genetic resource collection in China. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47(1):43–53.

DISCUSIÓN GENERAL

El uso de marcadores morfológicos del IBPGR y UPOV, así como los marcadores moleculares fueron muy útiles para diferenciar entre accesiones y especies de amaranto y tener una estimación de la diversidad presente dentro de los materiales en estudio del género *Amaranthus*.

Para hacer uso de los recursos fitogenéticos, no solo se debe de conservar el germoplasma, sino también conocer sus características morfológicas y posibles usos. La forma de conocer el germoplasma de manera fenotípica es por medio de la caracterización morfológica, esta actividad permite conocer atributos cualitativos y cuantitativos del germoplasma, con esta herramienta también se obtiene un parámetro de diversidad presente dentro de los materiales. Pero la principal limitante que tiene el uso de marcadores morfológicos, es que se ven afectados por la interacción genotipo-ambiente y por lo tanto no proporcionan estimaciones consistentes, su obtención consume bastante tiempo y a largo plazo resultan caros.

Mientras tanto el uso de marcadores moleculares es una técnica que se está adoptando para la caracterización de germoplasma, por las ventajas que ofrece en comparación con los marcadores morfológicos, por ejemplo son rápidos, abundantes, no son afectados por el ambiente y proporcionan estimadores consistentes de la diversidad genética (intra e inter poblacional). Pero también tienen algunas limitantes como el que los marcadores dominantes no distinguen a los genotipos heterocigotos; y otra para algunos marcadores es su baja

reproducibilidad. Por lo que hay que tomarlas en cuenta a la hora de escoger el tipo de marcador molecular a utilizar.

CONCLUSIÓN GENERAL

El uso de marcadores morfológicos permitió conocer la diversidad fenotípica cuantitativa y cualitativa presente dentro de los materiales de amaranto, detectándose la existencia de material genético apto para ser utilizado en programas de mejoramiento genético de la especie. Los marcadores moleculares permitieron evaluar la diversidad intra e inter poblacional. Se observó alta diferenciación entre las especies del género *Amaranthus* y la mayor parte de la diversidad genética estuvo presente entre las poblaciones más que dentro de estas. Se observó cercanía entre algunos materiales silvestres con los materiales de grano cultivados, lo que refuerza la teoría del origen de los materiales de grano y sus posibles progenitores silvestres. Hubo baja correlación entre los marcadores morfológicos y los moleculares, esto debido a que dicho marcadores evalúan a diferentes niveles, mientras los marcadores morfológicos evalúan a nivel fenotípico características principalmente de tipo adaptativo, mientras que los marcadores moleculares evalúan polimorfismos a nivel del genoma, principalmente de tipo neutros.

ANEXO 1

Descriptores de Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV)

DESCRIPTOR	CLAVE	NIVELES	NOTA
Pigmentación antociánica	PIGCO	PRESENTE	9
		AUSENTE	1
Pigmentación antociánica del hipocótilo	PIGHIP	PRESENTE	9
		AUSENTE	1
		DEBIL	3
Intensidad de la coloración antociánica del hipocotilo	INTCO	MEDIA	5
		FUERTE	7
		CORTA	3
Longitud	LONJOV	MEDIANA	5
		LARGA	7
		ESTRECHA	3
Anchura	ANJOV	MEDIANA	5
		ANCHA	7
		PEQUEÑA	3
Proporción largo/ancho	PROP	MEDIANA	5
		GRANDE	7
		EN MEDIO O LIGERAMENTE HACIA LA BASE	1
Posición de la parte más ancha	PARANC	MODERADAMENTE HACIA LA BASE	2
		FUERTEMENTE HACIA LA BASE	3
		DEBIL	1
Prominencia de nervaduras	PRONER	MEDIA	2
		FUERTE	3
		VERDE CLARO	1
Color principal del haz	COHAZ	VERDE MEDIO	2
		VERDE OSCURO	3
		ROJO	4
		PURPURA	5

DESCRIPTOR	CLAVE	NIVELES	NOTA
		ÁREA BASAL PIGMENTADA	1
Distribución del segundo color en el haz	2COHAZ	MANCHA CENTRAL	2
		MARGEN Y VENAS PIGMENTADAS	3
		VERDE	1
Color del envés	COENV	ROJO	2
		PURPURA	3
Margen	MARG	ENTERO	1
		SINUOSO	2
		PRECOZ	3
Época de aparición de inflorescencia	APINF	MEDIA	5
		TARDIA	7
		PRECOZ	3
Época de floración	EPFLO	MEDIA	5
		TARDIA	7
		VERDE	1
		AMARILLO	2
Tallo: color	COTA	ROSA	3
		ROJO	4
		PURPURA	5
		ROJO	1
Tallo: color de las rayas	CORA	PURPURA ROJIZO	2
		PURPURA	3
Pecíolo: pigmentación antociánica	PIGPE	PRESENTE	9
		AUSENTE	1
		MUY DÉBIL	1
		DÉBIL	3
Pecíolo: intensidad de la pigmentación antociánica	PIGPEIN	MEDIA	5
		FUERTE	7
		MUY FUERTE	9
		VERDE CLARO	1
Limbo: color principal	COLIM	VERDE MEDIO	2
		VERDE OSCURO	3
		ROJO	4

DESCRIPTOR	CLAVE	NIVELES	NOTA
Lámina de la hoja: presencia de mancha	MAN	AUSENTE	1
		PRESENTE	9
		PEQUEÑA	3
Limbo: tamaño de la mancha con relación al limbo	REMAN	MEDIANA	5
		GRANDE	7
		VERDE	1
Limbo: color de la mancha	COMAN	PLATEADA	2
		ROJO	3
		PURPURA	4
Limbo: forma de la mancha	FOMAN	OVALADA	1
		EN FORMA DE "V"	2
		AMARILLO	1
Inflorescencia: color	COIN	VERDE	2
		ROSADO	3
		ROJO	4
Inflorescencia: compacidad	COMIN	PURPURA	5
		PARDO	6
		COMPACTA	3
Inflorescencia: densidad de los glomérulos	DENGLO	INTERMEDIA	5
		ABIERTA	7
		LAXA	3
Inflorescencia: tipo	TIPIN	MEDIA	5
		DENSA	7
		AMARANTIFORME	1
Inflorescencia: longitud de las brácteas con relación al utrículo	LOGBRC	GLOMERULADA	2
		MAS CORTAS	1
		IGUAL	2
Inflorescencia: hábito de crecimiento	HABCRE	MAS LARGAS	3
		DETERMINADO	1
		INDETERMINADO	2
Inflorescencia: porte	PORIN	ERECTO O DÉBILMENTE RECURVADO	1
		INTERMEDIO	2
		FUERTEMENTE RECURVADO	3

DESCRIPTOR	CLAVE	NIVELES	NOTA
Inflorescencia: longitud	LOIN	CORTA	3
		MEDIA	5
		LARGA	7
Planta: época de madurez	EPMA	PRECOZ	3
		MEDIA	5
		TARDIA	7
Planta: longitud	LONPL	BAJA	3
		MEDIA	5
		ALTA	7
Tallo: pigmentación antociánica de la base	PIGBAS	AUSENTE	1
		PRESENTE	9
Tallo: forma de la sección transversal	SECTRA	CIRCULAR	1
		ONDULADO	2
		BLANCO	1
		AMARILLO	2
Color	COSE	ROSA	3
		MARRÓN	4
		NEGRO	5
Forma	FOSE	ELIPSOIDAL	1
		DISCOIDE	2
Tipo	TIPSE	CRISTALINO	1
		HERINOSO	2
Peso de 500 semillas	PESE	BAJO	3
		MEDIO	5
		ALTO	7

Descriptores de International Board for Plant Genetic Resources (IBPGR)

(COTA) Color de Tallo: En la floración

- 1) verde
- 2) verde con estrías rojas o púrpuras
- 3) rojo ó púrpura
- 4) dorado
- 5) mezcla de tallos de diferente color.

(FOHO) Forma de las hojas: en la floración

- 1) lanceolada
- 2) elíptica
- 3) cuneada
- 4) obovada
- 5) ovatinada
- 6) rómbica
- 7) ovalada
- 8) otra forma diferente.

(COHO) Color de las hojas: En la floración

- 1) lámina entera de color púrpura
- 2) hoja con área basal pigmentada
- 3) hoja con una mancha central
- 4) hoja con dos franjas en forma V
- 5) hoja con una franja en forma de V
- 6) hoja con margen y venas pigmentados
- 7) hoja con una franja verde pálido sobre verde normal
- 8) verde normal
- 9) verde oscuro
- 10) otro.

(COIN) Color de la inflorescencia: durante la floración

- 1) amarilla
- 2) verde
- 3) rosa
- 4) roja o púrpura
- 5) otro
- 6) mezcla de inflorescencia de diferentes colores.

(FOIN) Forma de la inflorescencia: durante floración

- 1) espiga
- 2) panícula con ramificaciones cortas
- 3) panícula con ramificaciones largas
- 4) inflorescencia con agrupación en el ápice
- 5) otras formas.

(DEIN) Densidad de la inflorescencia: durante floración

- 1) laxa
- 2) intermedia
- 3) densa o compacta.

(RALAT) Ramificación lateral: durante floración

- 0) sin ramificación
- 1) ramas cortas a lo largo del tallo
- 2) pocas ramas en la base del tallo
- 3) muchas ramas en la base del tallo
- 4) muchas ramas a lo largo del tallo.

(DF) Días a floración:

Se tomó el número de días de la emergencia hasta que el 50 % de las plantas presentaron floración (antesis).

(LOIN) Longitud de la inflorescencia: término de floración

Esta característica se midió en cm desde la base hasta el ápice de la inflorescencia, cuando la planta había llegado a madurez.

(ALP) Altura de planta: madurez de la planta

Esta variable se tomó desde el nivel del suelo hasta el ápice de la inflorescencia durante la madurez.

(ACAM) Acame: en madurez

- 1) sin acame
- 2) bajo
- 3) moderado y
- 4) alto.

(LOHO) Longitud de la hoja: la sexta u octava hoja de la base, después de la floración

Obteniendo el promedio de tres hojas.

(ANHO) Ancho de la hoja: de las hojas medidas en longitud, después de floración

(COSE) Color de semilla:

- 1) amarillo pálido
- 2) rosa
- 3) roja
- 4) café
- 5) negra
- 6) mezclas.

(TIPSE) Tipos de cubierta de semilla (testa): después de cosecha

- 1) cristalina
- 2) opaca
- 3) mezcla.