

UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZÁN
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AGRONÓMICA



**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA: MORFOLÓGICA Y
MOLECULAR DE KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.]
Standl.), DE LA REGIÓN HUÁNUCO**

TESIS PARA OPTAR TÍTULO DE: INGENIERO AGRÓNOMO

TESISTA:

Bach. EUCLIDES PÉREZ ZANABRIA

ASESORA:

Dra. MILKA TELLO VILLAVICENCIO

HUÁNUCO – PERÚ

2019

DEDICATORIA

Para mis padres, que entregaron todo el amor y sacrificio incondicional en todos estos años, gracias a ustedes logre llegar hasta aquí.

A mis hermanos que siempre han estado junto a mí, brindándome su apoyo incondicional y por compartir momentos agradables de mi vida.

AGRADECIMIENTO

A DIOS, por darme salud y bendición y permitirme llegar a este momento tan especial de mi vida.

Agradezco a la Universidad Nacional Hermilio Valdizan mi alma mater, por concederme el financiamiento para la realización de este trabajo de investigación.

Al laboratorio de Biotecnología molecular del programa de cereales y granos nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), por acogerme en sus instalaciones.

A mi asesora Dra. Milka Tello Villavicencio, por la orientación y ayuda brindada.

Estoy eternamente agradecido a mis amigos que me acompañaron en el proceso de la realización de este trabajo de tesis.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA: MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.), DE LA REGIÓN HUÁNUCO

RESUMEN

Se caracterizó genéticamente, empleando marcadores morfológicos y moleculares ISSR en 20 accesiones de kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) colectadas en la Región Huánuco. En la descripción morfológica, se utilizaron 17 descriptores cualitativos propuesto por Seminario (2012); en la descripción molecular, se utilizó 4 *Primer* ISSR; y en las evaluaciones agronómicas, se evaluaron preliminarmente 4 componentes de rendimiento. Para la caracterización morfológica se hizo un análisis de componente principal donde los dos primeros explicaron una variación del 88, 51 %, el primero componente explicó la mayor parte de variación (74,92 %) y discriminó accesiones por caracteres de: follaje, tallo, hoja, flor y raíz. El análisis de agrupamiento resultaron 4 grupos o morfotipos a un coeficiente de similitud de 1,45 distancia euclidea. Por otro lado en los resultados moleculares se obtuvieron 63 marcadores polimórficos con 4 iniciadores. El índice de contenido polimórfico más alto se obtuvo con los iniciadores IS-36 (0,37) y UBC 857 (0,28). Con el coeficiente SMC (*Simple Matching Coeficient*) de 0,89 cercano a 1 (máxima similitud) se observa 18 grupos. Esto nos indica que el 20 % de posibles duplicadas en el jardín de colecta. A una distancia de similitud de 0,75 se obtuvo 7 clúster, no habiendo coincidencias con los 4 morfotipos encontrados en la caracterización morfológica.

Palabra clave: *Mirabilis expansa*, marcadores agromorfológicos, marcadores molecular ISSR

**GENETIC CHARACTERIZATION: MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR
OF KUYACSA (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.), OF THE
HUÁNUCO REGION**

ABSTRACT

It was genetically characterized, using ISSR morphological and molecular markers in 20 accessions of Kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz and Pav.] Standl.) Collected in the Huánuco Region. In the morphological description, 17 qualitative descriptors proposed by Seminario (2012). in the molecular description, 4 First ISSR was used; and in agronomic evaluations, 4 performance components were preliminary evaluated. For the morphological characterization a principal component analysis was made where the first two explained a variation of 88.51%. The first component explained most of the variation (74,92%) and discriminated accessions by characters of: foliage, stem, leaf, flower and root. The grouping analysis resulted in 4 groups or morphotypes at a similarity coefficient of 1,45 Euclidean distance. On the other hand, in the molecular results, 63 polymorphic markers with 4 primers were obtained. The highest polymorphic content index was obtained with the IS-36 (0,37) and UBC 857 (0,28) primers. With the SMC coefficient (Simple Matching Coefficient) of 0.89 close to 1 (maximum similarity) 18 groups are observed. This indicates that 20% of possible duplicates in the collection garden. At a similar distance of 0,75, 7 clusters were obtained, with no coincidence with the 4 morphotypes found in the morphological characterization.

Keyword: *Mirabilis expansa*, agromorphological markers, ISSR molecular markers

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEORICO	3
2.1. Fundamentación teórica	3
2.1.1. La kuyacsa (<i>Mirabilis expansa</i> (Ruiz & Pav.) Standl)	3
2.1.2. Caracterización morfológica.	11
2.1.3. Caracterización molecular.	12
2.1.4. Marcadores Genéticos.	12
2.2. Antecedentes	17
2.3. Hipótesis	20
2.4. Variables y operacionalización de variables	20
<i>Variables:</i>	20
<i>Indicadores:</i>	20
III. MATERIALES Y MÉTODOS	21
3.1. Tipo y nivel de investigación	21
3.2. Lugar de ejecución	21
3.3. Población, muestra y unidad de análisis	23
3.4. Tratamientos en estudio	24
3.5. Prueba de hipótesis	26
3.5.1. Diseño de la investigación	26
3.5.2. Datos a registrar.	27
3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información.	31

3.6. Materiales y equipos	32
3.6.1. Caracterización morfológica	32
3.6.2. Equipos, Materiales y Reactivos de Laboratorio de biología molecular	33
3.7. Conducción de la investigación	36
3.7.1. Manejo agronómico	36
3.7.2. Caracterización molecular	37
3.8. Análisis de resultados	41
IV. RESULTADOS	46
4.1. Caracterización agromorfológica.	46
Distribución geográfica.	55
4.2. Caracterización molecular	57
V. DISCUSIÓN	61
5.1. Caracterización morfológica	61
Distribución geográfica.	62
5.2. Caracterización molecular	63
VI. CONCLUSIONES	66
VII. RECOMENDACIONES	67
VIII. LITERATURA CITADA	68

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 01.	Tratamientos en estudio (accesiones)	25
Cuadro 02.	Primers ISSR seleccionados.	40
Cuadro 03.	Componentes del mix para la PCR.	41
Cuadro 04.	Perfil térmico de la PCR para marcadores de ISSR	41
Cuadro 05.	Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componente principales de Kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl.)	47
Cuadro 06.	Descripción básica de los morfotipos y agrupamiento de las accesiones de kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl) colectados en la Región Huánuco.	47
Cuadro 07.	Agrupamiento de las 20 accesiones de Kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco, mediante método UPMA, con los 17 descriptores propuesto por Seminario (2012)	51
Cuadro 08.	Índice de contenido polimórfico de las 20 accesiones de kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl).	58
Cuadro 09.	Datos de pasaporte de las 19 accesiones de kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl).de la Región Huánuco.	76
Cuadro 10.	Descriptor morfológicos para mauka, (<i>Mirabilis expansa</i> (R & P.) Standley.)	77
Cuadro 11.	Promedio de las principales variables cuantitativas en caracterización morfológica de Kuyacsa (<i>Mirbilis expansa</i>), agrupadas por morfotipos	79
Cuadro12.	Índice de contenido polimorfoco calculados primer UBC 859. Mono = locus monomórfico.	80

Cuadro 13.	Índice de contenido polimorfoco calculados, primer UBC 807. Mono = locus monomórfico.	81
Cuadro 14.	Índice de contenido polimorfoco calculados, primer IS-36 y SSR4. Mono = locus monomórfico	82

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 01.	Hipótesis sobre el origen de distribución de <i>Mirabilis expansa</i> Cultivada. Adaptado de National Research Council, 1998.	4
Figura 02.	<i>Mirabilis expansa</i> (Ruíz & Pav.) Standl. A: Rama floreciente B: detalle de inflorescencia C: Semilla [x10]	7
Figura 03.	Ubicación del jardín de colecta de <i>Mirabilis expansa</i> .	22
Figura 04	Mapa de ubicación y zonas de colecta de <i>Mirabilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl	23
Figura 05	Croquis del campo experimental	27
Figura 06.	Emergencia de <i>Mirabilis Expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl.	28
Figura 07.	Inicio de botón floral de <i>Mirabilis Expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl.	29
Figura 08.	Inicio de floración de <i>Mirabilis Expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl.	29
Figura 09.	Cuantificación del ADN en el nanoBiofotómetro (IMPLEN).	39
Figura 10.	Electroforesis en gel de agarosa al 1 % mostrando la calidad de ADN	40
Figura 11.	Distribución de accesiones de Kuyacasa (<i>Mirabilis</i> [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco en el primero y segundo componente principal.	49
Figura 12.	Dendograma de distancia entre accesiones de kuyacsa (<i>Mirabilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco	50

Figura 13.	Morfotipo 1. (a) hoja sub cordada. (b) flor blanca (c) Pulpa blanca	52
Figura 14.	Morfotipo 2. (a) hoja cuneada. (b) flor blanca. (c) pulpa blanca	52
Figura 15	Morfotipo 3. (a) hoja cuneada. (b) flor purpura claro. (c) pulpa amarilla anaranjada.	52
Figura 16.	Morfotipo 4. (a) hoja cordada. (b) flor purpura.	53
Figura 17	Distribución geográfica de los morfotipos de <i>kuyacsa expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl)	56
Figura 18.	Dendograma de distancia entre las accesiones de <i>Kuyacsa (Mirabilis expansa</i> [Ruiz y Pav.] Standl) Punto de corte 0,75.	60
Figura 16-30	Panel de fotografías	83

I. INTRODUCCIÓN

Mirabilis expansa (Ruiz & Pav.) Standl., es una Nictaginácea tuberosa que se distribuye desde Venezuela hasta Chile al estado silvestre y cultivado. Su cultivo se concentra en las zonas alto andinas de Bolivia, Ecuador y Perú, donde es conocido como “mauka”, “miso” y “chago”, respectivamente. Es una de las especies más relegadas dentro del grupo de raíces y tubérculos andinos, RTAs (Vivanco 1999 citado por Seminario 2012). Mauka se ha ganado su estatus de "cultivo perdido" quizás incluso más que otros cultivos andinos abandonados, desde que fue descubierto por primera vez por la comunidad científica hace medio siglo y se ha mantenido en una relativa oscuridad desde entonces (Gendall 2017).

Su importancia radica en que posee raíces reservantes con mayor contenido de proteínas, calcio y fósforo con respecto a otras tuberosas, pudiendo complementar las deficiencias nutricionales del poblador andino (Franco y Uceda 1996). En otros estudios se ha encontrado que plantas del género *Mirabilis* poseen proteínas inactivadoras de ribosomas (Ribosome Inactivating Proteins) con propiedades antivirales, que impiden la infección de virus y viroides transmitidos mecánicamente en cultivos como papa y tomate previamente aplicados con extractos crudos de tales plantas (Vivanco, citado por Chía *et al* 2006).

La pérdida de material genético de kuyacsa plantea la necesidad de caracterizar y evaluar las accesiones, describiendo las características cuantitativas y cualitativas para discriminar entre ellas, formar colecciones, identificar duplicados en colección, ante tal situación los jardines de colecta y Bancos de germoplasma juegan un rol muy importante en la preservación de genes de interés y evitar pérdidas, estos son utilizados en trabajos de mejoramiento genético y multiplicación (Rojas *et al.* 2014)

El conocimiento de la variabilidad genética juega un papel esencial en su mejora y conservación de la variabilidad y existen distintas formas para su evaluación. El uso de descriptores, los descriptores son aplicados en la caracterización y evaluación de las accesiones debido a que ayudan a su diferenciación y a expresar el atributo de manera precisa y uniforme, lo que simplifica la clasificación.

Adicionalmente, en los últimos años se están incluyendo descriptores relacionados con los marcadores moleculares. Los componentes moleculares y el ADN, cada día es mayor para describir la variabilidad del germoplasma de una especie. La variabilidad o polimorfismo de estos marcadores son usadas en los diferentes estudios sobre la diversidad genética de las especies vegetales y su herencia puede ser monitoreadas (Franco *et al.* 2003)

El uso de Sistema de Información Geográfica (SIG) es unas herramientas alternativas de gran utilidad para completar la información faltante, y también para apoyar el análisis junto con toda la información sobre las accesiones (Thome 1995).

Objetivo general

Caracterizar genéticamente, empleando marcadores morfológicos y moleculares ISSR a las accesiones de kuyacsa de la Región Huánuco.

Objetivos específicos

- a) Caracterizar la diversidad genética a nivel morfológico, mediante la aplicación de descriptores específicos de kuyacsa.

- b) Determinar la diversidad genética a nivel genotípico, mediante los marcadores ISSR de las accesiones de kuyacsa.

II. MARCO TEORICO

2.1. Fundamentación teórica

2.1.1. La kuyacsa (*Mirabilis expansa* (Ruiz & Pav.) Standl)

a) Centro de origen

CIP (Centro Internacional de la Papa, 1998), Reporta que los primeros informes como planta cultivada aparecen en 1965 con J. Rea y J. León. Julio Rea estudió el cultivo en Perú, Bolivia y Ecuador. Rea llegó a la conclusión de que la Región de Cajamarca, Perú es el centro de distribución y la fuente de origen de mauka para Bolivia y Ecuador, se extendió por la migración humana durante el Imperio Inca (Rea y León, 1965). A fines de la década de los 80, en Cajamarca, tanto el INIA (Instituto Nacional de Investigación Agraria) y La Universidad de Cajamarca (Seminario) publican los primeros informes acerca de los hallazgos y colectas de la especie en la Región norte del Perú. La evidencia de la planta cultivada es cada vez mayor en este ámbito y ello conduce a plantear la hipótesis de un origen y domesticación Cajamarquinos, y una distribución hacia Bolivia y Ecuador en tiempo de los Incas (National Research Council, 1989), a través de migraciones de poblaciones ya sea forzada o voluntarias



Figura 01. Hipótesis sobre el origen de distribución de *Mirabilis expansa* Cultivada. Adaptado de National Research Council, 1998.

Fuente: Tomada de Seminario 2004

b) Taxonomía

Mirabilis expansa (Ruiz & Pav.) Standl se caracterizó a fines del siglo XVIII como parte de una expedición al Virreinato del Perú dirigida por Ruíz y Pavón. Los dos botánicos nombraron a la planta como *Calyxhymenia expansa* Ruíz & Pav.

Casi un siglo y medio después, el botánico estadounidense Standley volvió a caracterizar la planta como *Mirabilis expansa* (Ruíz y Pav.) Standley,

ubicándola dentro de la familia Nyctaginaceae y el género *Mirabilis* (Gendall 2017).

Según Standley (1931), la clasificación taxonómica de kuyacsa se detalla de la siguiente manera:

Reino: plantae

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Orden: Caryophyllales

Familia: Nyctaginaceae

Género: *Mirabilis*

Especies: *Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl

Pariente silvestre del cultivo: *M. postrata*, *M. intercedens*, *M. campanulata*

c) Descripción Botánica de *Mirbilis sp.* silvestre y cultivada.

1. Hábito de crecimiento.

Seminario, citado Gendall (2017), indican que el hábito de crecimiento es procumbente; por lo general no excede de 1 m de altura (silvestre).

Vertical cuando joven y semi - postrado y abierto en la madurez (cultivada).

2. Tallo.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura), citado por Gendall (2017:40) reporta que, los Tallos son cilíndricos, divididos por entrenudos (cultivada).

Seminario y Valderrama, (2012), indican que el color principal es verde - amarillo, verde, rojo - púrpura; a veces con pigmentación de color secundaria rojo - púrpura (cultivada).

Standley (1931:114), indica que las ramas son relativamente robustas, tallos de hasta 2,5 m de longitud, pero generalmente mucho más cortos, escasamente puberulentos a glabros, entrenudos generalmente más largos que las hojas (silvestre).

3. Hoja.

Centro internacional de la papa (CIP, 1998) reporta que, las hojas son opuestas, cordadas u ovadas, de color verde oscuro a verde claro, con o sin pigmentaciones purpuras.

Standley (1931), indica que las hojas son relativamente grueso, a menudo con márgenes rojos. Variando de ovado redondeado a ovado rómbico, ampliamente ovado, truncado ovalado elíptico u oblongo o agudo en la base; Casi siempre abruptamente decurrente, a veces cordado. Obtuso redondeado en el ápice. En pedicelos cortos y gruesos. Cerca de 2,5 - 5 cm de longitud (silvestre).

Según Seminario y Valderrama (2012), la hoja es ovada o cordada; con la base cordada, subcordada o cuneada y el ápice bastante agudo. Color predominante de la hoja amarillo verdoso, verde amarillo o verde; con pigmentación de color secundaria presente o ausente (rojo - púrpura) (cultivada).

4. Inflorescencia.

La inflorescencia es cimosa / paniculada termina en 3 - 4 flores agrupadas. Flores de 3 - 4 mm de largo, 3 - 4 mm de ancho cuando están

abiertas. Cáliz en forma de copa con 5 divisiones en la parte superior, persistente y en crecimiento. Corola delgada en la base, en forma de tubo, que se abre hacia arriba en 5 lóbulos. 3 estambres, pistilo formado por ovario inferior, esférico, que termina en un estilo curvo, ligeramente más largo que los estambres. Aproximadamente 25 - 30 días entre la aparición de las primeras flores y la antesis (Seminario 1988) (cultivada).

Perianto blanco, blanco grisáceo, púrpura brillante o púrpura; estigma amarillo - blanco, amarillo anaranjado, brillante púrpura o púrpura; brote amarillo, amarillo - marrón o rojo-púrpura; involucro verde o verde - púrpura (Seminario y Valderrama 2012) (cultivada).



Figura 02. *Mirabilis expansa* (Ruíz & Pav.) Standl. A: Rama floreciente | B: detalle de inflorescencia | C: Semilla [x10].

Fuente: Tomada de Rea y león 1965

5. Fruto.

El fruto es un aquenio, de forma elíptica ovoide. La semilla es única, de color marrón a crema (CIP 1998).

El cáliz crece para formar la fruta (antocarpio), envolviéndola casi por completo (característica de las Nyctaginaceae). La unión de la fruta y la envoltura del antocarpio es cónica, de 3 - 4 mm de longitud y 1,5 - 2.5 mm de ancho, y está cubierta por abundantes pelos pegajosos. Fruta cubierta por una sustancia viscosa, especialmente en el vértice donde los pequeños insectos son atrapados con frecuencia (Seminario citado por Gendall, 2017) (cultivada).

6. Tallo subterráneo.

Hinchazón de tallos típicos de Nyctaginaceae, de color blanco, amarillo brillante o naranja - gris (Seminario y Valderrama, 2012) (cultivada).

7. Raíz.

Forma: fusiforme, claviforme o cilíndrica, grande y redondo en la punta y afiladamente debajo. Raíz primaria del núcleo dominante sobre las raíces laterales. (Seminario 2004) (Cultivada).

Raíz epidermis blanca, pardo amarillo, gris anaranjado brillante, gris anaranjado; corteza de la raíz (raspando la epidermis) blanco, amarillo, amarillo anaranjado; pulpa de la raíz blanca, naranja - blanca, naranja-amarilla (Seminario y Valderrama 2012) (cultivada). No existe descripción para raíces de *Mirabilis sp.* silvestres.

d) Aspectos agronómicos

Aunque biológicamente es una planta perenne, por su utilización es una planta anual.

La propagación puede ser asexual y sexual. En la forma asexual (la más común), se pueden utilizar los tallos subterráneos engrosados. También se pueden usar brotes tiernos desprendidos de la corona, o porciones de tallo (esquejes). Una práctica campesina consiste en cosechar las raíces y dejar las coronas enterradas en el campo. Otra alternativa es recoger las coronas y ponerlas en pozos cubiertos con tierra. Cuando se utiliza tallos subterráneos la emergencia se produce entre los 20 - 30 días (Seminario 2004).

La semilla botánica es ortodoxa, pudiendo almacenarse por varios años sin pérdida considerable de su poder germinativo. Semillas almacenadas durante varios años a temperatura de 18 °C, perdieron su poder germinativo a un ritmo de 4 % por año. Las plántulas provenientes de semilla botánica generan durante los primeros meses una raíz pivotante engrosada. Posteriormente, con el aporque, se generan otras raíces tuberizantes, desde la corona. Sin embargo, éstas últimas no llegan a ser tan abundantes como las generadas por semilla asexual.

Las formas de cultivo más comunes son: pocas plantas alrededor de otros cultivos o en asociación con el maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), Chiclayo (*Cucurbita ficifolia*) y otros cultivos. También se asocia con la arracacha (*Arracacia xanthorrhiza*) y el llacón (*Smallanthus sonchifolius*) y en ocasiones sale espontáneamente en campos de trigo (*Triticum vulgare*). En pocas ocasiones se encuentran parcelas de monocultivo. En los huertos familiares está asociado a diversas hortalizas. En Puno, se encontró cultivada en huertos familiares junto con arracacha, llacón, maíz, papa, tarwi (*Lupinus mutabilis*) y varias hortalizas exóticas. También es posible encontrarlo asociado a diversas arvenses en terrenos en descanso (Seminario 2012).

e) Importancia de la kuyacsa

Mirabilis expansa [Ruiz y Pav.] Standl, es una especie promisorio como alimento humano y animal, además de otros usos potenciales. El follaje obtenido después de la cosecha, contiene hasta 4 % de proteína en base fresca (17 % en base seca), es un importante forraje para ovinos, vacunos y animales menores. Los valores de consumo, digestibilidad y conversión alimenticia en conejos (*Oryctolagus cuniculus*), fue similar a los valores de la mezcla de ryegras (*Lolium multiflorum*) y trébol (*Trifolium repens*) (Bazán *et al.* Citado por Seminario 2012)

La parte principal usada como alimento humano son sus raíces reservantes. Estas, además de ser fuente de carbohidratos, contienen niveles importantes de proteína, calcio y fósforo. Por estas bondades constituye una alternativa alimentaria para poblaciones alto andinas, en donde la ingesta de estos nutrientes es escasa (Seminario 2012).

f) Ecología y distribución geográfica

En Perú, los hallazgos en Puno se han producido entre los 2 900 y 3 300 msnm y en el norte de este país, se ha determinado su presencia en altitudes que oscilan entre 2 500 a 3 400 msnm. Estas últimas altitudes corresponden a la Región quechua (2 300 - 3 500 msnm), con una temperatura promedio entre 13 - 14 °C, temperatura máxima de 25 °C, mínima de 5 °C y precipitación pluvial promedio anual de 680 mm. Prefiere suelos de pH cercano al neutro, de textura media, profundos, con buena provisión de materia orgánica (Chota). También prospera en suelos de color claro, de textura franco arenosa, con buena provisión de materia orgánica (Huamachuco) (Seminario 2004).

El cultivo se mantiene en pequeñas huertas y en forma marginal en altitudes entre los 2 600 y 3 500 msnm; es muy apreciado en las comunidades de valles templados, para la alimentación humana y animal. Se cultiva

asociado con el maíz, cucúrbitas u otras plantas (National Research Council citado por seminario 2012).

g) Diversidad genéticos de Kuyacsa

No existen cultivares definidos, sin embargo, las plantas se diferencian por el color de la raíz, distinguiéndose la “blanca”, “Amarilla” y “anaranjada clara”. Al presente se dispone de tres colecciones de germoplasma para la especie cultivada en el Perú y Ecuador, donde se hizo la caracterización y se conserva material en bancos activos. En Cajamarca existen 32 accesiones en la estación experimental Baños del Inca, y tres en la facultad de Agronomía de la Universidad Técnica de Cajamarca; en Ecuador existen tres accesiones en la estación experimental de Santa Catalina (Rea 1982)

Seminario (2012) manifiesta que, la variabilidad morfológica de la colección de mauka del norte peruano, está constituido de cinco grupos o morfotipos. Los morfotipos I, III y V se concentran en las provincias de Hualgayoc, San Miguel, Chota y Cajamarca. El morfotipo II probablemente es endémico de la Región La Libertad. La única entrada del sur del Perú (Puno), constituyó un morfotipo independiente (IV)

2.1.2. Caracterización morfológica.

La caracterización morfológica se basa en atributos o estados observables o medibles referentes a la forma, aspecto, estructura o comportamiento del todo o partes del ciclo vital del individuo. Pueden consistir en el empleo de características botánicas, fenológicas y agronómicas. Se conoce que tienen variación entre individuos y frecuentemente son convertidos en descriptores estandarizados (Saad y Rao 2001). Se eligen aquellos caracteres de alta heredabilidad; sin embargo, estos rasgos resultan de la expresión de un número limitado de genes y son dependientes de la interacción con el medio ambiente (Chía 2009)

Un descriptor es un atributo cuya expresión es fácil de medir de la forma, estructura o comportamiento de una accesión. Sirve para discriminar entre fenotipos. Los descriptores son altamente heredables, pueden ser detectados a simple vista y se expresan de igual forma en todos los ambientes. Los órganos más importantes para la descripción morfológica son aquellos que están menos influenciados por el ambiente; los más importantes son; la flor y el fruto en importancia decreciente las hojas, tronco, ramas, raíces y los tejidos celulares (July 2007).

2.1.3. Caracterización molecular.

Se considera bajo esta denominación los constituidos por fragmentos de ADN; pueden ser de tamaño muy diferentes, desde pequeñas secuencias hasta grandes trozos que pueden contener algún gen.

La variabilidad genética de una especie puede ser explorada mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN, los cuales son puntos de referencia que funcionan como huellas de diferentes regiones del genoma, que pueden o no corresponder a un gen específico, son ampliamente utilizados en genética, permiten evidenciar variaciones (polimorfismos) en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen éstas o no su fenotipo. Son de utilidad en estudios evolutivos y de genética poblacional, manejo de bancos de germoplasma, identificación, protección legal de germoplasma, mapeo, selección asistida por marcadores y clonado de genes (García 2012)

2.1.4. Marcadores Genéticos.

a) Marcador morfológico.

Los primeros marcadores utilizados en estudios de caracterización y de genética de poblaciones fueron los marcadores morfológicos, los cuales identifican caracteres altamente heredables empleados en la determinación

de frecuencias génicas, flujo y deriva génica y en la identidad de los individuos. Los marcadores morfológicos son una buena opción para los estudios de variación. En la actualidad existe una tendencia a utilizarlos junto con los marcadores moleculares, sin embargo, la correlación de los marcadores morfológicos con los moleculares no siempre es satisfactoria, ya que los primeros se ven afectados por múltiples factores y en la mayoría de los casos son el resultado de la expresión de más de un gen (Lewin citado por Rodríguez 2016).

Son los inmediatos visibles, al menos fácilmente detectables, aunque normalmente hay que esperar al desarrollo completo de la planta para su manifestación. Pocos dentro de ellos son neutros en relación con dicho desarrollo y, en general, con cualquier actividad vital, como cabe esperar los genes que suelen intervenir en complejas cadenas metabólicas (Cubero 2013).

b) Marcadores moleculares

En genética, un marcador molecular es un segmento de ADN diferenciado cuyo patrón se transmite de generación en generación y se puede detectar mediante diversas técnicas, es así como cualquier diferencia en la secuencia de ADN entre dos o más individuos pueden servir de marcador genético (Hartl y Jones 2009). Un marcador debe fundamentalmente ser selectivo neutralmente, es decir, no estar influenciado por el medio ambiente (siendo esta característica una de sus principales ventajas frente a otros marcadores), así mismo debe de seguir las leyes mendelianas de herencia para poder ser usados como herramientas para detectar patrones taxonómicos, de diversidad y demográficos (Selkoe y Tönen 2006).

Son secuencias del ADN que pueden ser usadas para analizar mínimas Variaciones genotípicas (polimorfismos) sin la intervención de factores

ambientales, además tienen la ventaja de poder cubrir todo el genoma y de ser relativamente fijos o perennes. Son usados con muchos propósitos, entre ellos están los estudios taxonómicos, estudios de filogenia y evolución, para trazar rutas de domesticación, para estudiar las relaciones entre diversidad y ambiente y para estudiar el “pool génico” completo de un cultivo o la diversidad en una parte específica de un pool génico (Soto 2006).

Según Cubero (2013), Los tipos principales de marcadores de ADN, son los siguientes:

RLFP (Restriction Fragment Length Polymorphism): los RLFP fueron los más utilizados hace unos años, pues permitieron por primera vez la construcción de mapas saturados. Al ser secuencias largas, la probabilidad de que el ADN de una sonda se encuentre repetido en el genoma de un organismo es prácticamente nula. Los RFLP, son, por tanto, los más parecidos a un gen; pueden considerarse, de hecho, como genes silenciosos, sin mensaje codificado. Los mapas construidos con ellos son tan fijos como los que se hubieran formado con genes auténticos.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa (*Polymerase Chain Reaction: PCR*). Es mucho más rápida y sencilla que la técnica anterior permitiendo mapear cientos de marcadores en poco tiempo. Consiste en amplificar secuencias de ADN utilizando cebadores (“primers”) sintetizados con un número pequeño de nucleótidos al azar. Para la amplificación se utiliza una polimerasa (TAQ) que tiene la propiedad de no disminuir su actividad a elevadas temperaturas.

AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism): combinan características de RFLP y de RAPD al amplificarse selectivamente por PCR los fragmentos de restricción. Como en el caso de los RFLP, el ADN se digiere con enzimas de restricción (normalmente dos). Los fragmentos obtenidos se

ligan a adaptadores de secuencias conocidos de unos 20 pares de bases y se amplifica por PCR; vuelve a ligarse con cebadores que son los adaptadores anteriores con uno o dos nucleótidos más en posiciones 3', lo que permite una nueva amplificación selectiva de un número más reducido (pero aun enorme) de fragmentos, que se separan por electroforesis en acrilamida y se detectan por radiactividad o fluorescencias. La combinación de enzimas de restricción, adaptadores y cebadores hace que el número de AFLPs posible sean infinito.

SCAR (Sequence Characterised Amplified Region): un SCAR consiste en un fragmento de ADN genómico que se identifica por amplificación mediante PCR usando un par de cebadores específico de al menos de 14 nucleótidos. Estos cebares se obtienen tras clonar y secuenciar los dos extremos de un marcador RAPD o AFLP.

Microsatelites (SSR: short Sequence Repeats): se basan en ADN, generalmente de un máximo de 100 pares de bases, formadas por secuencias repetidas de di o penta nucleótidos. Una vez localizados tales ADN, que son frecuentemente en el genoma, se secuencian las zonas que las flanquean y se construyen con ellas cebadores que, debido a los extremos, serán la secuencia única (se procura evidentemente que los extremos tengan la longitud suficiente), y debido al fragmento repetido entre ellos, podrían aparearse en numerosos puntos del genoma, esto es, puede haber innumerables "loci"; los "alelos" de un mismo locus son secuencias con distinto número de repeticiones del motivo (GA, CAC, etc.) repetido; las combinaciones de numerosos "loci" con innumerables "alelos" hace que el total de microsatélites sea ilimitado.

El número de polimorfismos a que dan lugar es, pues, muy elevado, con ventajas sobre RAPD y AFLP: son codominantes, de alta reproducibilidad y dan lugar a puntos fijos de mapa. Son ideales para identificación varietal.

Una ventaja adicional es que el análisis se hace, como el de los RAPD y AFLP, por PCR.

a) Marcadores ISSR

Es un marcador molecular conocido como secuencias repetidas intersimples. Esta es una técnica relativamente nueva y es similar a los RAPDs, excepto que en los ISSRs el primer es un di o trinucleotido repetido. Los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear (Eguiarte *et al* 2007).

Son técnica basada en PCR, es de característica semiarbitraria debido a que se utiliza un solo primer de 14 pb o más, complementario a dos microsatélites cercanos presentes en el genoma. La amplificación ocurrirá si ocurre un adecuado alineamiento de los iniciadores y la distancia entre éstos sea de 100 a 2500 pb, o más dependiendo de las condiciones PCR. Por otro lado, la región no será amplificada (banda ausente) si existe divergencia entre los sitios de unión y los iniciadores, si uno de los sitios de unión no existe y/o si existen rearrreglos estructurales (genómicos o cromosómicos) (Zietkewicz *et al.* citado por Chía 2009).

Los marcadores ISSR se encuentran dentro de los marcadores basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Técnicas como ISSR, AFLP o RAPD son sistemas de marcadores dominantes y por lo tanto no permiten la detección de variabilidad en los alelos. Sin embargo, son fáciles de implementar e implican un menor costo (Vijayan citado por Uribe), esto aplica especialmente para ISSR, por lo que se está implementando cada vez de forma más frecuente en estudios filogenéticos, de diversidad genética, mapeo genético, entre otros (Reddy *et al.* 2002).

Ventajas

Las ventajas que ofrece esta técnica se centran principalmente en la alta variación que detecta, así como en su reproducibilidad debida principalmente a las altas temperaturas de alineación utilizadas en la PCR. Asimismo, no son necesarias altas concentraciones de ADN. Por otro lado, para diseñar los primers no es necesario conocer la secuencia del genoma del organismo en estudio. Pueden visualizarse tanto en geles de agarosa como de acrilamida. Finalmente, son sencillos de montar, rápidos, eficientes y poco costosos (Lynch y Milligan citado por Eguiarte *et al.* 2007).

Desventajas

En cuanto a las desventajas, la homología de las bandas es incierta. Y dado que son marcadores dominantes, no permiten el cálculo de ciertos parámetros que exigen distinguir a los heterocigos de los homocigos dominantes. Asimismo, para estimar la heterocigosis poblacional es necesario asumir a priori que la población se encuentra en equilibrio de Hardy-Weinberg, por lo que las estimaciones de heterocigosis y estructuración genética pueden sesgarse un poco, aunque existen correcciones estadísticas (Eguiarte *et al.* 2007).

2.2. Antecedentes

Morillo (1998), en su tesis Análisis de polimorfismo en la colección de Jiacama (*Polymnia sonchifolia* P&E) Y Miso (*Mirabilis expansa* R&p) del banco de germoplasma del INIAP, caracterizó morfológica y agronómicamente 11 entradas de miso colectadas en 2 provincias de Ecuador y uno entrada procedió de Perú, utilizando 20 descriptores (12 morfológico y 8 agronómico), morfológicamente se definieron dos grupos principales y subtipos dentro de la colección, estos morfotipos presentan diferencias en cuanto a las variables, habito de crecimiento, color de tallo principal, color de haz y nervadura de la

hoja y color de la flor, y varían en color de epidermis y de la pulpa de las raíces entre accesiones. La caracterización molecular con la técnica RAPDs permitió analizar mayor polimorfismo y esto, el bajo número de fragmentos polimórficos en relación a la cantidad de partidores utilizados en la amplificación del ADN, indicó que la cantidad que la variabilidad genética de este germoplasma es baja, debido a su restringida distribución geográfica.

Chía (2006), realizó estudios sobre la diversidad genética molecular de *Mirabilis expansa*, mediante los marcadores RAPD, y conocer la distribución de la variación genética a nivel intra e interregional, analizaron 37 accesiones pertenecientes al Banco de Germoplasma del Programa de Biodiversidad de Raíces y Tubérculos Andinos de la Universidad Nacional de Cajamarca, utilizando para la extracción del ADN el protocolo de Tai & Tanskley (1990), con algunas modificaciones en mayor concentración de NaCl y sin nitrógeno líquido; se ensayaron 19 iniciadores RAPD decaméricos, usando 4 accesiones tomadas al azar. Las pruebas PCR se realizaron en un termociclador Perkin Elmer 9700. Se obtuvieron 60 marcadores polimórficos con 9 de 19 iniciadores decaméricos. Se calcularon los índices de iniciador RAPD, obteniéndose los valores más altos con los iniciadores OPA04, OPA09 y OPA13. Con el coeficiente de Simple Matching y el algoritmo UPGMA se obtuvo un dendograma del cual, a un coeficiente de 1, se observan 31 grupos. Con un índice de similitud de 0,85 se encontró que se forman 8 clusters o grupos, sin coincidir en su mayoría con los 5 morfotipos reportados.

Seminario y Valderrama (2012), determinaron la variabilidad morfológica, mediante la aplicación de descriptores morfológicos estandarizados, analizaron la distribución geográfica y han evaluado el comportamiento agronómico de la colección de mauka del Programa de Raíces y Tubérculos Andinos de la Universidad nacional de Cajamarca, que procede principalmente del norte peruano e incluye una entrada de Puno.

Para esta investigación se usaron 40 entradas de la especie cultivada.. La caracterización y el análisis de agrupamiento se realizaron mediante descriptores morfológicos para mauka, *Mirabilis expansa* (R. &P.) Standley. Los colores fueron calificados mediante la RHS Colour Chart (1995). Con los datos de campo, se construyó una matriz básica de datos (MBD) y se realizó el análisis multivariado el cual comprendió el análisis de agrupamiento produciendo un fenograma. En el análisis de la distribución, se señalaron los sitios de colecta y se hizo la distribución geográfica de las entradas agrupadas en morfotipos. Se evaluaron siete componentes del rendimiento agronómico, en cinco plantas por entrada y en tres campañas agrícolas (2005 – 2007): Altura de planta (cm), número de raíces por planta, peso de raíces por planta (kg), rendimiento de raíces (t. ha⁻¹), largo y diámetro de raíces (cm) y peso de follaje (kg). El fenograma generó cinco grupos o morfotipos (coeficiente de disimilitud de 0,0) alcanzaron los más altos rendimientos (46 – 76 t/ha). Concluyeron provisionalmente que la mayor variabilidad se encuentra en la Región Cajamarca e indica que son necesarias las exploraciones de otras regiones entre ellas Huánuco.

Muenala (2019), realizó la investigación “evaluación de la variabilidad genética del miso *Mirabilis expansa* Ruiz & Pav. Standley”, en esta investigación se estudió la etnobotánica y la características morfoagronómica 7 entradas de kuyacsa (*Mirabilis expansa*) en los cantones Pedro Moncayo (Pichincha) y Cotacachi (Imbabura), las variables evaluadas fueron: 12 características cuantitativas y 12 cualitativas. Los resultados obtenidos presentaron dos caracteres discriminantes que sirven para identificar los grupos genéticos, con este dato se establecieron tres grupos, dentro de ellas se identificaron dos morfotipos diferenciándose por el color la hoja y la raíz, el rendimientos que se obtuvo de las accesiones estaban por encima de los 2.5 kg/planta y con valores mayores a 10 raíces/planta, además presentaron 29 cm de largo y 5 cm de diámetro.

2.3. Hipótesis

- a) Si se aplica la caracterización agromorfológica a las accesiones de kuyacsa mediante descriptores específicos se determinará la variabilidad morfológica.
- b) El uso de marcadores moleculares ISSR permitirá estudiar la diversidad genética a nivel genotípico de kuyacsa.

2.4. Variables y operacionalización de variables

Variables:

- a) Marcadores agromorfológicos.
- b) Marcadores de ADN

Indicadores:

1. número de raíces por planta.
2. peso de raíces por planta (kg).
3. longitud de raíz reservante (cm).
4. Diámetro de raíz reservante.
5. Descriptor morfológico de kuyacsa. (cuadro 10)
6. Porcentaje de polimorfismo.
7. Contenido de Información Polimórfica (PIC).
8. Dendogramas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Tipo y nivel de investigación

El tipo de investigación aplicada, porque se basó en los principios de la ciencia sobre los aspectos de biología molecular y morfología vegetal, para conocer, la diversidad con la que se cuenta de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl en la Región Huánuco.

Es descriptivo, porque se describen las variables en estudio: (marcadores ISSR y características morfológicas en kuyacsa) y se determinó la variabilidad en la lectura de vidrio y mediante los descriptores morfológicos.

3.2. Lugar de ejecución

a) Fase de campo:

El proyecto se ejecutó en el centro poblado de Mitocucho, Distrito de Quisqui

✓ Posición geográfica:

Altitud : 2 930 msnm
Latitud sur : 9°53'11.60" S
Longitud oeste : 76°26'13.10" O

✓ Ubicación geográfica:

Región : Huánuco
Provincia : Huánuco
Distrito : Quisqui
Centro poblado : Mitocucho

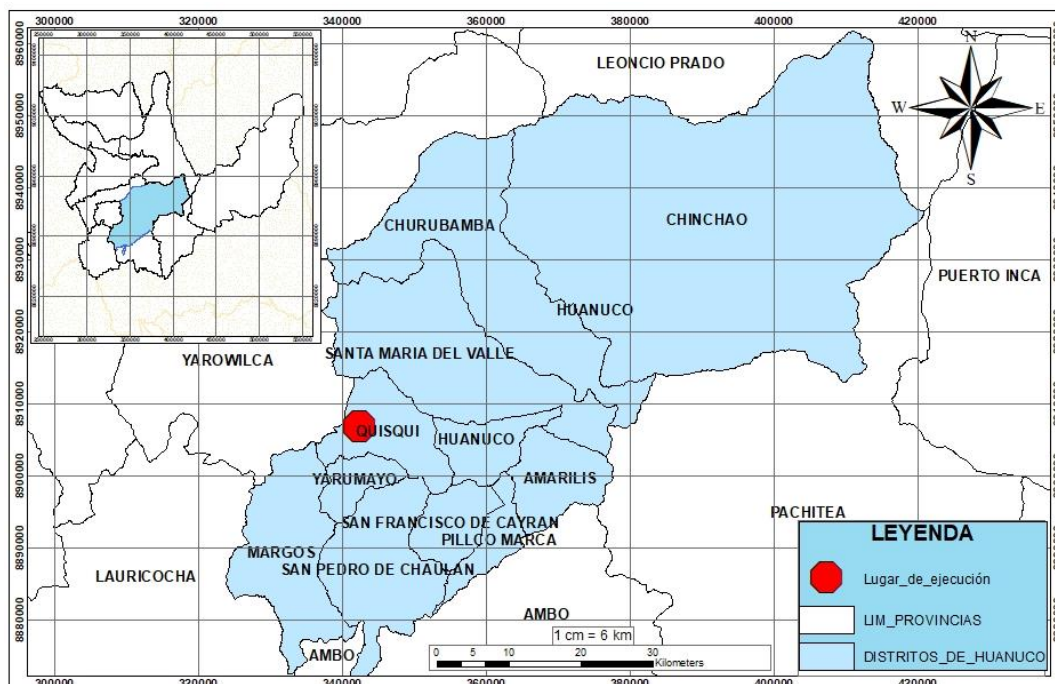


Figura 03. Ubicación del jardín de colecta de *Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.

✓ Condiciones agroecológicas

Según la ONER (Oficina Nacional de Evaluación de Recursos Naturales 2009) La zona donde se realizó el trabajo de investigación corresponde a La zona de vida bosque muy húmedo - montano tropical. La temperatura media anual 13,6 °C y 28 °C una evapotranspiración entre 2 - 4 mm; precipitación anual de 570 mm; humedad relativa de 64 %.(SENAMHI).

b) Fase de laboratorio

Para la caracterización molecular el proyecto se ejecutó en el laboratorio de Biotecnología molecular del programa de cereales y granos nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), Lima, Perú.

3.3. Población, muestra y unidad de análisis

Población

Estuvo compuesta por las 20 accesiones de *Kuyacsa* (*Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl, una accesión se encontró al estado silvestre. Fueron colectados en los diferentes centros poblados de las provincias de Huánuco, Maraón, Pachitea, Yarowilca, Huamalies y Huacaybamba de la Región Huánuco (figura 04). Estos fueron Instaladas en el jardín de colecta de Mitocucho Distrito de Quisqui - Huanuco.

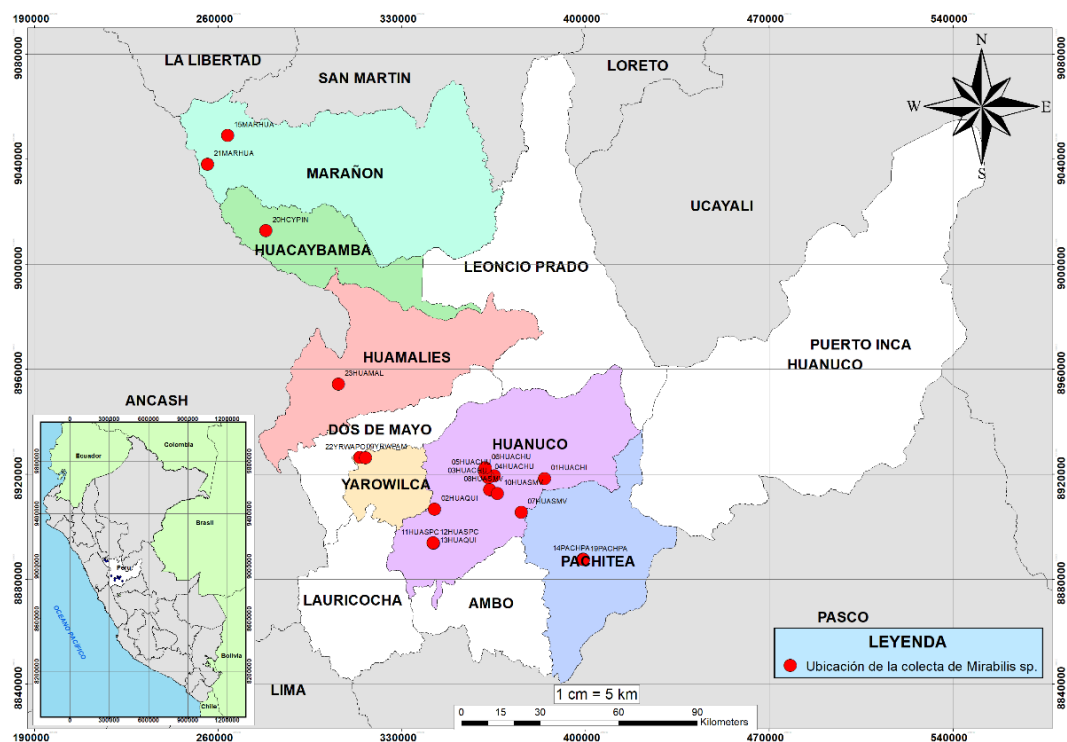


Figura 04. Mapa de ubicación y zonas de colecta de *Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl

Muestras

Estuvo compuestas por 10 individuos por accesión, de las cuales se tomaran 5 individuos al azar para la caracterización morfológica.

De los 5 individuos tomados al azar se colectó las muestras de hojas para su extracción y obtuvo una muestra de ADN.

Tipo de muestreo

No probabilístico, porque la muestra se seleccionó por conveniencia.

Unidad de análisis

La unidad de análisis, está conformada por las accesiones del cultivo de kuyacsa, instaladas en el jardín de colecta del centro poblado de Mitotambo distrito de Quisqui

3.4. Tratamientos en estudio

En este trabajo se consideró que cada entrada representa un tratamiento, cada tratamiento estaba conformada por 10 repeticiones conformada por cada individuo de Kuyacsa (*Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.) (Cuadro 01).

Cuadro 01. Tratamientos en estudio (accesiones)

Tratamiento	Código de la accesión	Provincia	Distrito	Localidad	Altitud (msnm)
1	01HUACHI	Huánuco	Acomayo	Chacamarca	2930
2	02HUAQUI	Huánuco	Quisqui	Mitocucho	2762
3	03HUACHU	Huánuco	Churubamba	Rayan pata	2885
4	04HUACHU	Huánuco	Churubamba	Marag	3220
5	05HUACHU	Huánuco	Churubamba	Shacua	3414
6	06HUACHU	Huánuco	Churubamba	Paccha	3082
7	07HUASMV	Huánuco	Santa María del Valle	Santa Rosa	2817
8	08HUASMV	Huánuco	Santa María del Valle	Pichuy	3000
9	09YRWPAM	Yarowilca	Pampamarca	Garu	3433
10	10HUASMV	Huánuco	Santa María del Valle	Ratacocha	3050
11	11HUASPC	Huánuco	San Pedro de Chaulan	Gantupata	3444
12	12HUASPC	Huánuco	San Pedro de Chaulan	Irapata	3370
13	13HUAQUI	Huánuco	Quisqui	Witco	2842
14	14PACHPA	Pachitea	Panao	Yuracmarca	3285
15	15MARHUA	Marañón	Huacrachuco	Pumachupay	2994
16	19PACHPA	Pachitea	Panao	Yuracmarca	3300
17	20HCYPIN	Huacaybamba	Pinra	Rayan	2840
18	21MARHUA	Marañón	Huacrachuco	Huachumay	3162
19	22YRWAPO	Yarowilca	Aparicio Pomares	Acobamba	3014
20	23HUAMAL	Huamalies	Chavín de Pariarca	Perla pampa	3279

3.5. Prueba de hipótesis

3.5.1. Diseño de la investigación

El diseño fue no experimental, porque no se manipulo deliberadamente las variables, lo que se hizo es observar fenómenos tal como se dan en su contexto natura para luego analizarlo.

Características del jardín de colecta

Área 1

Largo del campo	:8 m
Ancho del campo	:6.5 m
Área total 1	:52 m ²

Área 2

Largo del campo	12 m
Ancho del campo	7 m
Área total 2	84 m ²

Área total (Área 1 + Área 2)	136 m²
Área neta experimental	81 m ²
Área total de calles	:55 m ²
Distancia entre surco	:1 m
Distancia entre plantas	:0,5 m
Numero de surcos	:14
Número de plantas/Tratamiento	10
Número total de Plantas/campo experimental	200

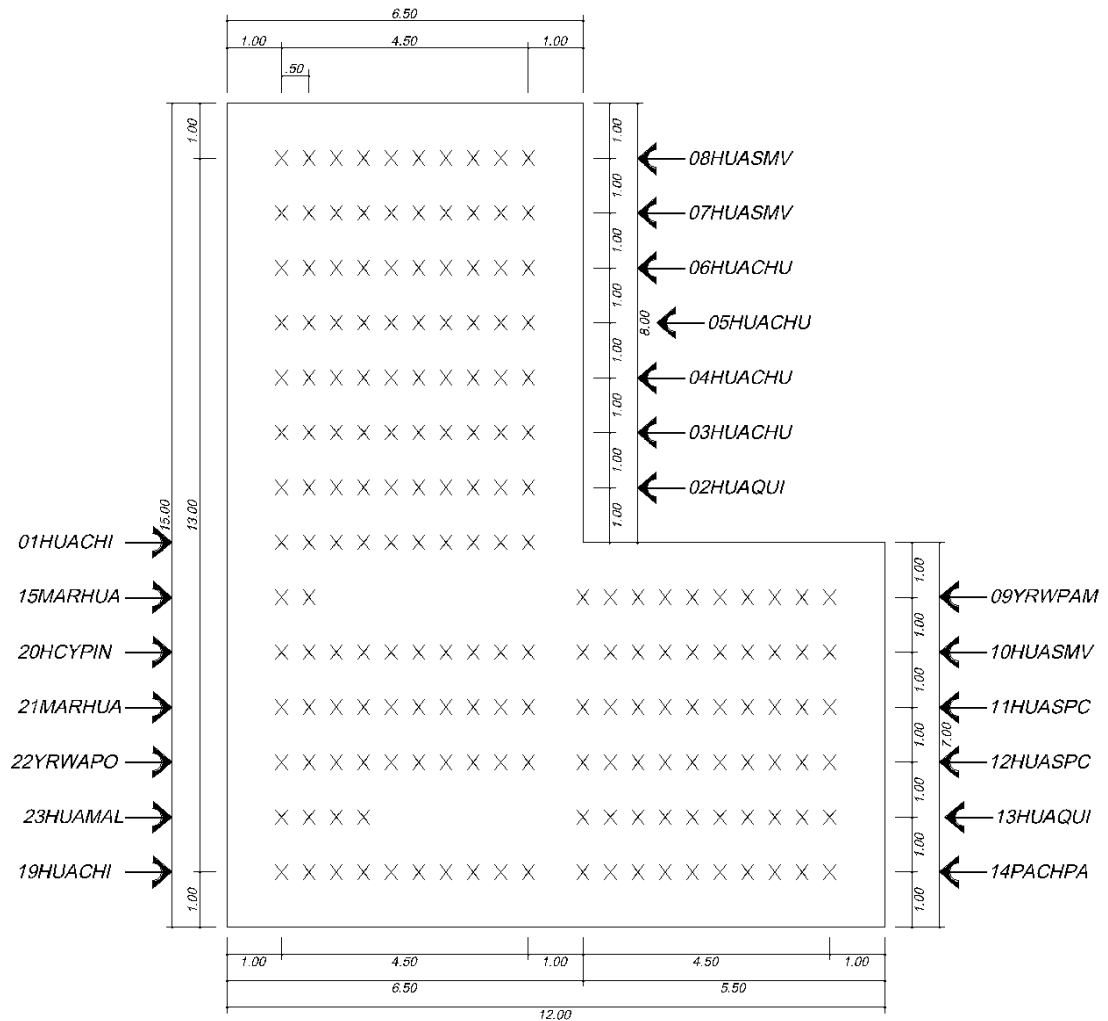


Figura 05. Croquis del campo experimental

3.5.2. Datos a registrar.

a. Caracterización morfológicas

La caracterización se realizó en una sola campaña, se consideró una lista de 17 descriptores cualitativos (cuatro de tallos, cinco de hojas, cinco de flores, y tres de la raíz) recomendados por Seminario (2012), Los datos de hojas se tomaron al inicio de la floración y los colinos y raíz se tomaron al momento de la cosecha (11 meses), Los colores fueron calificados mediante *RHS Colour Chart* (Seminario 2012).

Distribución geográfica

Los datos de distribución de la kuyacsa fueron obtenidos de las visitas realizadas a los agricultores (colecta). Los datos fueron tomados con un GPS Montana 680, se tomaron los datos de latitudes, longitudes y altitudes. De la misma forma fueron tomados los nombres de fundos, caserío o centro poblados, Distrito y Provincia de procedencia.

b. Evaluaciones fenológicas

Se evaluaron tres componentes fenológicas, sobre las 10 plantas por tratamiento (accesión). Las características evaluadas fueron:

✓ Emergencia

Se consideró los días transcurridos entre la siembra y el estado de emergencia

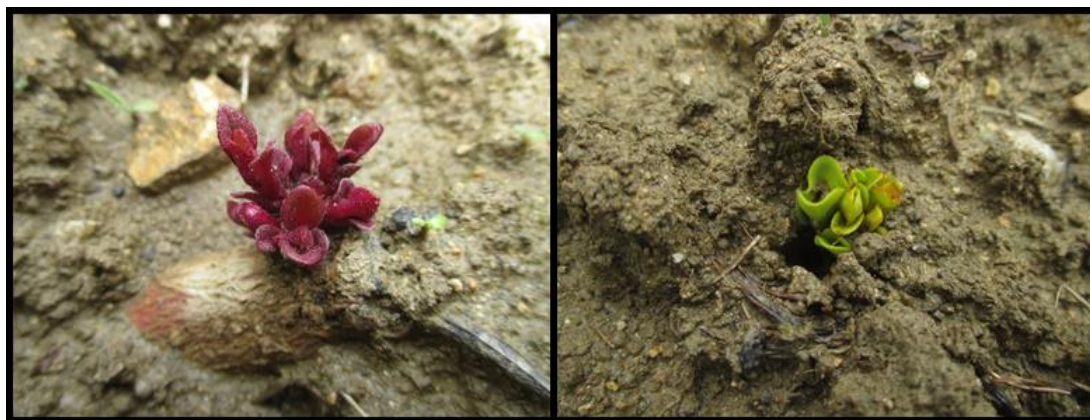


Figura 06. Emergencia de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.

✓ Inicio del botón floral

Número de días computados desde la fecha de siembra a la aparición del botón floral en el 50 % de las plantas por accesión.



Figura 07. Inicio de botón floral de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl

✓ Floración

Número de días contados desde la siembra hasta la emisión de las primeras flores del 50 % individuos por tratamiento (accesión).



Figura 08. Inicio de floración de *Mirabilis Expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.

c. Evaluación agronómicas

Se evaluaron cuatro componentes agronómico: número de raíces por planta, peso de raíces por planta (kg), longitud de raíz reservante (cm) y diámetro de raíz reservante (cm). Los datos fueron ingresados en una hoja de cálculo de Excel, para el análisis correspondiente.

✓ **Numero de raíces reservantes por planta**

Se realizó en la etapa de maduración fisiológica (11 meses). Se contó las raíces útiles que presentaban todas las características apropiadas para su consumo.

✓ **Peso de raíces reservantes por planta (kg)**

Después de la cosecha se tomaron las raíces de la planta, realizando el pesado correspondiente en una balanza.

✓ **Longitud de la raíces reservantes**

Para esta evaluación se eligió todas las raíces que tienen un valor comercial y de consumo. El largo de la se midió con una cinta métrica para lo cual se partió la raíz en forma longitudinal.

✓ **Diámetro de raíces reservantes (cm)**

El diámetro se midió en la parta media en 10 raíces por accesión

d. Caracterización molecular

✓ **Escaneado y lectura de bandas (scoreo)**

Se realizó el scoreo de los geles para el análisis de datos, construyéndose una matriz binaria de “0” para las ausencias de bandas y “1” para las presencias. Se consideraron sólo aquellas bandas que presentaron una intensidad uniforme, aquellas que fueron borrosas o muy tenues no se consideraron para evitar errores. Esta información de bandas se ingresó en hoja de cálculo de Microsoft Excel 2013.

3.5.3. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información.

a. Técnicas e instrumentos bibliográficos

▪ Fichaje

Este proceso nos permitió la recopilación y extracción de datos importantes de las fuentes bibliográficas como: libros, artículos científicos, internet y fuentes no bibliográficas; para la elaboración del marco teórico

▪ Análisis de contenido

Esta técnica se utilizó para el análisis sistemático de documentos escritos; para la redacción del marco teórico. Se trató de estudiar con detalle el contenido de la comunicación escrita.

▪ Instrumentos bibliográficos

Bibliográficas: Libros y Tesis.

Hemerográficas: revista, internet.

▪ Fichas de investigación

Textuales.

Resumen.

Comentario.

▪ Instrumentos de laboratorio

Guías de laboratorio.

Manual de laboratorio.

Protocolos.

▪ **Procesamiento de información**

Los datos obtenidos serán ordenados y procesados en computadora utilizando programas especializados para cada uno de los análisis.

3.6. Materiales y equipos

3.6.1. Caracterización morfológica

Materiales biológicos:

Accesiones de kuyacsa (semillas asexuales)

Material no biológico

- Cuaderno de Campo.
- Bolsas de polipropileno.
- Esticker.
- Lápiz.
- Lapicero.
- Plumo indeleble.
- Borrador.
- Chaquitacla.
- Azadón.
- Pico.
- Wincha.
- Cuchillo.
- Tijera de podar.
- Vernier.
- Descriptor propuesto por seminario (2012).
- Cartilla de colores.
- Balanza.

Equipos

- GPS.
- Cámara fotográfica.
- Computadora.
- Memoria USB.
- Calculadora.

3.6.2. Equipos, Materiales y Reactivos de Laboratorio de biología molecular**Reactivo:**

- Silicagel,
- Tampón de extracción.
- Etanol al 96 % y 70 %.
- Cloroformo Alcohol isoamílico (24:1)
- Tampón Tris EDTA (TE) pH 8.
- RNAsa 10 mg/ml.
- Agua MiliQ.
- Agarosa 1 %.
- Bromuro de etidio.
- Tampón de carga.
- Buffer de corrida TBE 1x.
- dNTPs 5 mM.
- Set de iniciadores ISSR.
- Enzima Taq-DNA polimerasa 5 U/ μ l.
- buffer PCR 10x.
- MgCl₂ 25 mM.
- Acrilamida.
- Tetramethylethylenediamine.
- Persulfato de amonio al 10 %.

- Repelente.
- Adherente.
- Alcohol al 96 %.
- Buffer de corrida.
- TBE 1x y 0,5X.
- 100 bp DNA.
- Ladder Plus.
- Solución de fijación.
- Solución de Tinción.
- solución de revelado.

Herramientas:

- Bolsas Ziploc.
- sobres de papel.
- Bisturí.
- Pinza.
- papel toalla.
- Billas de metal.
- Tubos eppendorf de 1.5ml.
- Puntas plásticas de 100 y 1000 μ l.
- Cubetas de cuarzo.
- Cámara de electroforesis horizontal.
- Peines.
- Pipetores de 10, 100, 200 y 1000 μ l.
- Placas para PCR.
- Tubos de 500 μ l.
- Vidrios con y sin muesca.
- Separadores.

- Cámara de electroforesis vertical.
- Bandejas de plástico y tapas de plástico.
- Gradillas para tubos.
- Racks.
- Probetas de 100, 500 y 1000 ml.
- Beakers.
- Picetas.
- Guantes de nitrilo y vinilo.
- Papel toalla, Papel de aluminio.
- Parafilm.

Equipo

- Molino Bead Mill Reach MM200.
- Centrífuga (Eppendorf).
- Campana extractora de gases.
- Termomixer (Eppendorf), Biofotómetro (Eppendorf).
- Purificador de agua, Agitador magnético (Heidolph).
- Fuente de poder (BIO-RAD power pac 300).
- Termociclador.
- Fuente de poder.
- Balanza analítica.
- Autoclave.
- Congelador -20 °C.
- Refrigeradora 4 °C.
- Horno microondas
- Potenciómetro.

3.7. Conducción de la investigación

3.7.1. Manejo agronómico

Esta actividad se realizó una semana antes de la siembra; Se preparó con la ayuda de una Chaquitacla y Pico. El terreno fue roturado, mullido, nivelado y surcado hasta obtener un campo listo para la instalación.

a) Roturación del terreno.

Esta actividad se realizó cuando el terreno se encontraba en su capacidad de campo, con la ayuda de una chaquitacla a una profundidad de 0,25 a 0,30 cm lo cual es la profundidad de la capa arable.

b) Mullido y nivelación.

Esta labor se ejecutó inmediatamente después de la roturación; el mullido se realizó con la ayuda de un pico, desterronando los terrones que dificultaban la nivelación.

c) Surcado

Los surcos se realizaron contra la pendiente para evitar erosión del suelo en las épocas de alta precipitación. La pendiente del surco fue de un 2 %, para que pueda drenar con facilidad el agua, evitando así la formación de charcos. El distanciamiento entre surco fue de 1 m y una profundidad de 20 cm.

d) Preparación propágulos (semilla asexual)

Cada propágulo se cortó en secciones conformadas de cuatro y cinco nudos. Para la selección de propágulos se consideró la calidad y la sanidad de los propágulos.

e) Siembra de propágulos

Se utilizó semilla asexual, tallos subterráneos engrosados (esquejes), brotes tiernos desprendidos de la corona y tallos aéreos. Un propágulo por golpe, con un distanciamiento de 1 m entre surco y 0,5 m entre plantas y a una profundidad de 5 a 10 cm.

f) Riego

El primer riego se realizó inmediatamente después de su instalación, y luego de acuerdo a la necesidad del cultivo.

g) Deshierbo

El control de malezas se realizó manualmente utilizando un pico, eliminando todas las malezas con finalidad de evitar la competencia por nutrientes, agua y luz, además las malezas son hospederos de plagas y enfermedades.

3.7.2. Caracterización molecular**a) Colección y almacenamiento de material vegetal**

Se colectaron hojas jóvenes en buen estado y en buenas condiciones fitosanitarias. En la colecta las hojas se utilizaron herramientas desinfectadas con alcohol, por cada muestra.

Una vez colectada las muestras se almacenaron en una bolsa ziploc que en su interior contenían 50 gramos de silicagel, esta cantidad permite mantener en condiciones favorables hasta 10 hojas pequeñas.

b) Mullido de las muestras

Se tomaron muestra seca de un hoja y se colocaron en tubos eppendorf de 1.5 ml que contenían 5 billas de acero estériles que luego fueron molidas

en un molino Bead Mill Retsch MM200 por un tiempo de 10 minutos y una frecuencia de 30 Hz o 1/s, que permitió obtener un polvo fino del tejido vegetal.

c) Extracción de ADN

El procedimiento de extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo CTAB modificado de Doyle y Doyle (1990)

P1

1. Llevar al molino la muestra por 10 minutos.
2. Agregar 700 μ l (Buffer CTAB2X + β mercapetanol) en la campana extractora mezcla por inversión
3. Llevar al termomixer a 65 °C por 45 minutos.
4. Agregar 700 μ l (cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1)) bajo la campana extractora (mescla por inversión).
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 5 minutos
6. En tubos nuevos transferir el sobrenadante
7. Agregar 500 μ l etanol de 96 % (mescla por inversión)
8. Llevar a -20 °C (mínimo 24 horas máximo 24 horas)

P2

9. Centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos
10. Eliminar teniendo cuidado de no votar el ADN.
11. Agregar 1000 μ l 75 %
12. Centrifugar 13 000 rpm durante 5 minutos
13. Eliminar el sobrenadante, teniendo cuidado de votar el ADN.
14. Agregar 1000 μ l etanol 96 %
15. Centrifugar a 13 000 rpm durante 5 minutos
16. Eliminar el sobrenadante, teniendo cuidado de no votar el ADN
17. Dejar secar toda la noche los tubos abiertos (cubrir con papel para que no se contamine)

P3

18. Agregar 150 μl de agua miliq
19. Llevar al termomixer a 65 °C por 15 minutos.
20. Spin de 10 segundos.
21. Llevar a -20 °C.

P4

Descongelar -4 °C (MM y ARNasa) – MM spin

22. Agregar 2 μl de ARNasa.
23. Spin de 10 segundos.
24. Llevar al termomixer a 37 °C por una hora.
25. Spin de 10 segundos.
26. En tubos nuevos y pequeños agregar 2 μl de la muestra madre + 198 μl de agua miliq.
27. Con pipeta
28. Guardar la muestra madre a -20 °C.

• Cuantificación y calidad de ADN

Para cuantificación de DNA extraído se utilizó un el nanobiofotómetro modelo IMPLEN (figura 09).



Figura 09. Cuantificación del ADN en el nanoBiofotómetro (IMPLEN).

La calidad (integridad) del ADN se testeó por electroforesis en gel de agarosa al 1 %, visualizado con Luz UV. (Figura 10)



Figura 10. Electroforesis en gel de agarosa al 1 % mostrando la calidad de ADN.

d) Amplificación por PCR de las regiones microsatelitales

Previo a la amplificación se preparó el mix que se detallan en el (cuadro 03), para la elección de los primers, se realizó el screening de 21 marcadores ISSR, seleccionándose finalmente 4 primer según la nitidez del patrón obtenido y los que mostraron mayor polimorfismo (cuadro 02).

Cuadro 02. Primers ISSR seleccionados.

Orden	Nombre	Secuencia
1	UBC 859	5'-TGT GTG TGT GTG TGT GRC -3'
2	UBC 807	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GT -3'
3	IS-36	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GTC -3'
4	SSR4	5'-BDB CAC ACA CAC ACA -3'

Las reacciones de amplificación de PCR se ajustan a un volumen final de 7,45 µl, cuya composición fue la siguiente (cuadro 03).

Cuadro 03. Componentes del mix para la PCR.

Componentes	Cantidad por individuo
DNAX	3 μ l
Gotaq Mix 5x	1,5 μ l
Primer x	1 μ l
H ₂ O _{mq}	1,95 μ l

Se tomó en cuenta el protocolo de amplificación que se muestra en la (Cuadro 04) donde se aprecia que se tienen 34 ciclos de amplificación. La PCR se llevó a cabo en un termociclador Biorad.

Cuadro 04: Perfil térmico de la PCR para marcadores de ISSR

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo (Minutos)	Ciclos
Desnaturalización inicial	95	3	1
Desnaturalización	94	1	
Hibridación	40	1	34
Extensión	72	1	
Extensión final	72	7	1
Mantenimiento	4	∞	

Fuente: tomado UNALM

3.8. Análisis de resultados

3.8.1. Análisis de datos morfológicos

Con los datos obtenidos de la caracterización morfológica y evaluación de los morfotipos, se construyó la matriz básica de datos (MBD) en Microsoft Excel 2013 para su análisis. La MBD es de forma bidimensional de tipo $n \times p$,

donde la “n” columna representa el descriptor y la “p” fila, significan el tratamiento, que son las accesiones o entradas de *Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl (cuadro 01), en cada cuadrícula de la MBD se registraron los códigos que pertenecían a los estados de cada variable (Crisci y López 1983, Hidalgo 2003).

La MBD permitió realizar el análisis estadístico multivariado mediante el programa NTSYSpc 2.02g (Numeral Taxonomy System). Este programa nos permitió realizar el análisis de agrupamiento y el análisis de componentes principales. El análisis de agrupamiento es clasificar un conjunto de “n” accesiones en un número pequeño de grupos o conglomerados, a través de un fenograma que permite identificar los grupos o entidades morfológicamente diferentes e identificar los elementos que constituyen duplicados (elementos morfológicamente similares). Por otro lado, el análisis de componentes principales (ACP) permitió saber cuáles variables están o no asociadas y el sentido de esta asociación. También permite saber cómo se distribuyen los morfotipos y cuáles tienen mayor semejanza entre ellos y permite demostrar el valor discriminatorio de los caracteres, con respecto a las entradas (Franco e Hidalgo 2003)

a) Análisis multivariado

Las técnicas estadísticas multivariadas nos permitieron caracterizar el germoplasma, debido a que básicamente nos permitirá a describir y agrupar el conjunto de accesiones, tomando en cuenta simultáneamente varias características, sin dejar de considerar la relación existente entre todos los caracteres en estudio (Franco e Hidalgo 2003).

✓ **El análisis de componentes principales (ACP)**

Desde el punto analítico, este método se basa en la transformación de un conjunto de variables cuantitativas originales en otro conjunto de variables independientes no correlacionadas, llamadas componentes principales. Los componentes deben ser interpretados independientemente unos de otros, ya que contienen una parte de la varianza que no está expresada en otro componente principal (López e Hidalgo 1994)

El ACP concentra toda la variación presente en la matriz de datos originales en unos pocos ejes o componentes. Los componentes principales contienen información en diferentes proporciones de todas las variables originales y su número depende del número de éstas que se incorporen en el análisis. La contribución de las variables a cada componente principal se expresa en valores y vectores propios. El valor propio representa la varianza asociada con el componente principal y decrece a medida que se generan dichos componentes. En cambio, el vector propio contiene los coeficientes de las combinaciones lineales de las p variables originales.

En base a la matriz básica de datos de Excel se calculó y analizo el componente principal de las accesiones de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl con el programa NTSYSpc 2.2g esto nos permitió conocer la relación existente entre las variables y la semejanza entre las accesiones, para saber cómo se distribuye las accesiones, cuáles se parecen y cuáles no. También permitió seleccionar las variables más discriminatorias (Franco e Hidalgo 2003).

✓ **Análisis de conglomerado o Cluster**

El análisis de conglomerado se aplicó para la clasificación de las accesiones de kuyacsa (*Mirabilis* (Ruiz & Pav.) Standl.) en grupos relativamente homogéneos con base en la similitud existente entre ellas.

Se utilizó el programa NTSYSpc 2.2g, se operó utilizando el coeficiente Simple Matching Coeficient (SMC), para obtener la matriz de similitud entre las unidades taxonómicas operativas (OTUs). El método de conglomerado o clúster se aplicó sobre una matriz de distancia, el método de agrupamiento usado en el análisis conglomerado fue jerárquico, que formó grupo en varios niveles. En el agrupamiento los resultados se presentaron en forma de diagrama de árbol (dendograma)

Para la formación de los conglomerados por este método jerárquico se utilizó el métodos UPGMA (unweighted pair-group method arithmetic average) y SAHN (sequential, agglomerative, hierarchical, nonoverlapping) – clustering (Franco e Hidalgo 2003).

3.8.2. Análisis de datos moleculares

Los productos de la amplificación fueron anotados en una matriz de datos binaria en Microsoft Excel 2013, se colocó el valor de "1" si hay presencia de banda y "0" si hay ausencia de banda. Se considerarán sólo aquellas bandas que presentaron una intensidad uniforme, aquellas que fueron borrosas o muy tenues no se consideraron para evitar errores.

a) Análisis de agrupamiento

Para el análisis de datos se ingresarán éstos dato a una matriz básica de datos con el paquete estadístico NTSYSpc 2.02g y se corrió la opción de análisis multivariado, obteniendo una matriz de similitud utilizando el Coeficiente de Concordancia Simple o *Simple Matching Coeficient* (SMC) (Crisci y López, citado por Chía 2006). Para el análisis de agrupamientos se utilizó el programa NTSYSpc 2.02g, basado en el UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), con el objetivo de obtener el dendograma. (Zhang *et al.* Citado por Chía 2006).

b) Estimación del contenido polimórfico

Se identificaron los polimórficos según el índice contenido de polimorfismo (PIC) que es la capacidad de cada iniciador (primer) para detectar loci polimórfico. El valor más alto de PIC indica el primer mas informativo. En el caso de marcadores ISSR se consideró la siguiente fórmula.

$$PIC = 1 - [(p/n)^2 + (q/n)^2]$$

p = frecuencia de bandas presentes.

q = frecuencia de bandas ausentes.

n = el total de bandas presentes en la población,

c) Datos del Sistema de Información Geográfica (SIG)

Los datos que se tomarán con el equipo GPS serán introducidos en el programa Excel. Una vez terminado el trabajo de campo, los datos serán insertados al software ArcGIS para su procesamiento y análisis. Con este programa, se diseñarán el mapa de distribución espacial de la presencia de kuyacsa en la Región Huánuco.

IV. RESULTADOS

4.1. Caracterización agromorfológica.

4.1.1. Análisis multivariado.

El análisis multivariado tiene el propósito de reducir el volumen de información. El análisis multivariado se realizó a través del análisis de componente principal y análisis de conglomerado.

a) Componentes principales.

El análisis de componente principal muestra que los primeros tres componentes poseen un valor propio característico ≥ 1 (Cuadro 05) siendo estos aceptables para su análisis, concentrando el 97,94 % de la variación de los 17 caracteres, para discriminar las 20 accesiones en estudio. Se puede observar que la varianza absoluta de los componentes disminuye a medida que el valor propio disminuye, el primer componente explica el 74,92 % de la varianza total y está asociado a los caracteres de color de follaje, color principal de tallo aéreo, color secundario de tallo aéreo, color de tallo subterráneo, color predominante del haz de la hoja, color secundario del haz de la hoja, color de botón floral, color de las brácteas del involucro, color del perigonio, color venas de lóbulos de perigonio, color estigma, color externo de la corteza de la raíz reservarte , color de la corteza de raíz al raspado y color de la pulpa de la raíz reservante todos ellos con un coeficiente de correlación alto que esta entre -0,794 a 0,996. El segundo explica el 13,59 % de variación y a este se le atribuye los Base de lámina y Ápice de lámina con un coeficiente de correlación de 0,82 y -0,82 respectivamente. El tercero componente explica un 8,23 % de variación y el carácter que más atribuye es base de lámina con un coeficiente de correlación de -0,787, estos tres componentes fueron los

que más aportaron a la variación del germoplasma evaluado con los descriptores estandarizados por (Seminario 2012).

Cuadro 05. Valores propios y proporción de la varianza explicada en el análisis de los componente principales de Kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.)

Componentes principales	Valor propio $\beta > 1$	Proporción de la varianza total explicada	
		Absoluta (%)	Acumulada (%)
CP1	12,74	74,92	74,92
CP2	2.31	13,59	88,51
CP3	1,6	9,43	97,94

Cuadro 06. Descripción básica de los morfotipos y agrupamiento de las accesiones de kuyacsa (*Mirabilis expansa*) colectados en la Región Huánuco.

Componente principal	% de variancia total	Caracteres	Coefficiente de correlación
CP1	74,92	Color de follaje	0,996
		Color principal de tallo aéreo	0,996
		Color secundario de tallo aéreo	0,849
		Color de tallo subterráneo	-0,839
		Color predominante del haz de la hoja	0,794
		Color secundario del haz de la hoja	0,996
		Color de botón floral	0,973
		Color de las brácteas del involucre	0,996
		Color del perigonio	0,973
		Color venas de lóbulos de perigonio	0,996
		Color estigma	0,973
		Color externo de la corteza de la RR	-0,927
		Color de la corteza de raíz al raspado	-0,839
		Color de la pulpa de la raíz reservante	0,839
CP2	13,59	Base de lamina	0,82
		Ápice de lamina	-0,82
CP3	9,43	Forma de lamina	-0,787

La correlación de los dos primeros componentes principales tiene una mayor importancia, porque explica el 88,51 % de la variación total y podemos confirmar el agrupamiento de cuatro grupos (figura 11): **Grupo 1.** 02HUAQUI, 03HUACHU 04HUACHU, 05HUACHU 06HUACHU, 10HUASMV, 11HUASPC, 12HUASPC, 09YRWPAM, este grupo se diferencia por 2 caracteres de hoja, con respecto al grupo 2, la Base de lámina, Ápice de lámina y color de la corteza de la raíz al raspado. **Grupo 2.** 08HUASMV, 13HUAQUI, 20HCYPIN, 22YRWAP0, 21MARHUA 23HUAMAL, 07HUASMV y estos se diferencian por forma de lámina base de lámina ápice de lámina, color de la corteza de la raíz al raspado. **Grupo 3,** 14PCHPA, 19PCHPA y 01HUACHI, estas tres accesiones se diferencian del grupo 1 y grupo 2, por el color del follaje, color principal del tallo aéreo, color secundario del tallo aéreo, color del tallo subterráneo, color predominante del haz de la hoja, color del botón floral, color de las brácteas del involucro, color del perigonio, color venas del lóbulo de perigonio, color de estigma, color externo de la corteza de la raíz, color de la pulpa de la raíz reservante. En el **grupo 4,** se encuentra la accesión 15MARHUA que se diferencia del grupo 1 y grupo 2 en las mismas características señaladas en el grupo 3. La discriminante con respecto al grupo 3 son las siguientes: color del botón floral, color del perigonio, color del estigma, color externo de la corteza de la raíz, color de la pulpa de la raíz reservante.

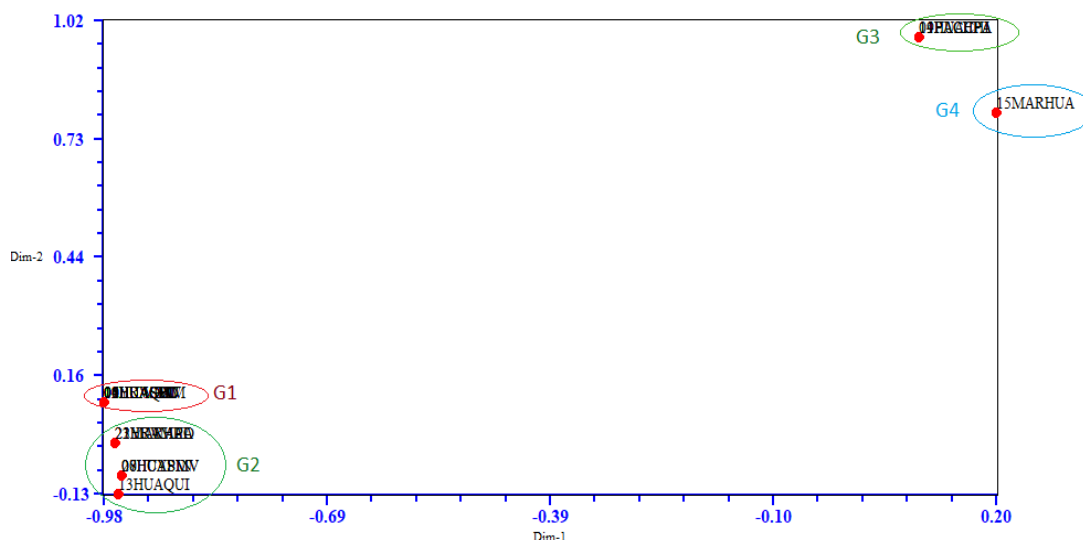


Figura 11. Distribución de accesiones de Kuyacasa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco en el primero y segundo componente principal.

b) Análisis de agrupamiento.

Con los datos de la matriz básica de datos (MBD) se realizó el fenograma (Figura 12), mediante el programa NTSYS, por el método conglomerado UPGMA, este programa nos permitió realizar el análisis de agrupamiento. El dendograma resultante muestra 4 grupos formados en el punto de corte 1,45 distancia Euclídea, lo que comprende que existe 80 % de duplicados: estos grupo está formado por:

Grupo 1. Está integrada por 9 accesiones (02HUAQUI, 03HUACHU, 04HUACHU, 05HUACHU, 06HUACHU, 10HUASMV, 11HUASPC, 12HUASPC, 09YRWPAM). **Grupo 2.** Formada por 7 accesiones (08HUASMV, 13HUAQUI, 20HCYPIN, 22YRWAPO, 21MARHUA y 23HUAMAL, 07HUASMV). Este grupo está formado por sub grupos morfológicamente similares, que provienen de 5 provincias diferentes de la Región Huánuco. **Grupo 3.** Formada por 3 accesiones (14PCHPA, 19PCHPA y 01HUACHI).

Grupo 4. Solo se encuentra una accesión, no se agrupa con ninguna accesión dentro del fonograma, 15MARHUA.

Si se consideramos el coeficiente de máxima similitud (0,00) se observa que se forman 6 grupos (70 % de duplicados): **grupo 1**, de 3 elementos 14PCHPA, 19PCHPA y 01HUACHI. **Grupo 2**, de un elemento 15MARHUA, **Grupo 3**, de 9 elementos, 02HUAQUI, 03HUACHU 04HUACHU, 05HUACHU 06HUACHU, 10HUASMV, 11HUASPC, 12HUASPC, 09YRWPAM. **Grupo 4**, de 3 elementos, 08HUASMV, 20HCYPIN, 07HUASMV. **Grupo 5**, de 3 elementos 22YRWAP, 21MARHUA y 23HUAMAL. **Grupo 6**, de un elemento, 13HUAQUI.

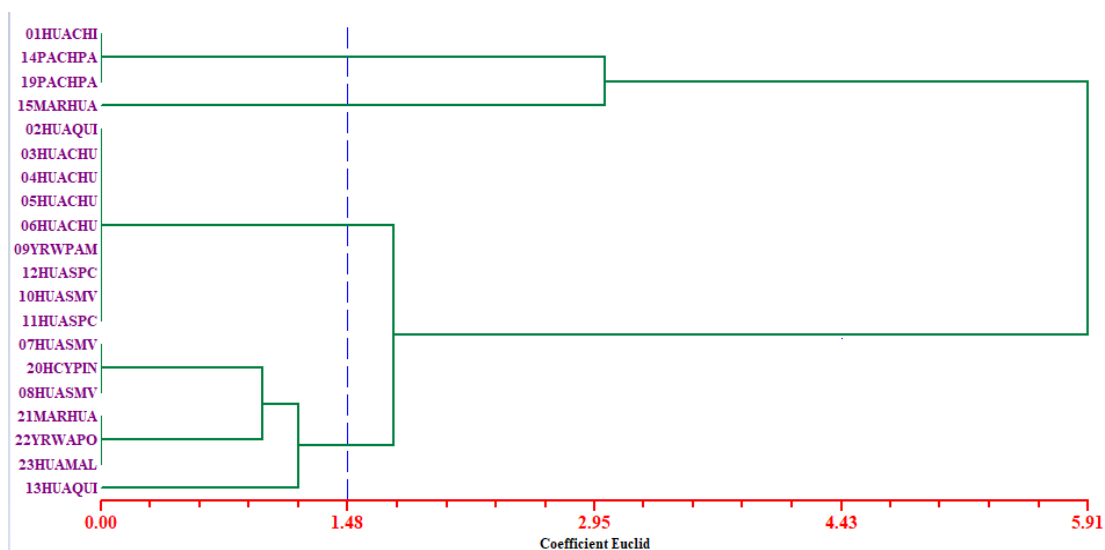


Figura 12. Dendrograma de distancia entre accesiones de kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco.

4.1.2. Descripción morfológica de los morfotipos.

Las características morfológicas que contribuyen a la identificación y discriminación entre morfotipos fueron el color del perigonio, color del estigma, Color de la pulpa de la raíz reservante. La forma de lámina, base de

lámina, ápice de lámina y color de la flor son las principales características para diferenciar los morfotipos. Dentro de las accesiones de flor purpura existen dos morfo tipos (morfotipo 3 y morfotipo 4), uno es cultivada y la otra silvestre los cuales se diferencian, color del perigonio, color del estigma, color externo de la corteza de la raíz, forma de lámina, base de lámina, ápice de lámina, color de la pulpa de la raíz. De la misma manera dentro de los morfotipos de flor blanca (morfotipo 1 y morfotipo 2) las discriminantes que contribuyen son: forma de lámina, base de la lámina y ápice de la lámina.

Cuadro 07. Agrupamiento de las 20 accesiones de Kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl) de la Región Huánuco, mediante método UPMA, con los 17 descriptores propuesto por Seminario (2012)

		Morfotipos			
		Morf. 1	Morf. 2	Morf. 3	Morf. 4
Tallo	Color principal del tallo aéreo	Verde amarilla	Verde amarilla	Verde	Rojo purpureo
Hoja	Forma de lamina	Cordada	Ovada	Ovada	Cordada
	Base de lamina	Subcordada	Cuneada	Cuneada	Cordada
	Ápice de lamina	Medianamente agudo	Estrechament e agudo	Medianamente agudo	Estrechamente agudo
Flor	Color de botón floral	Amarillo	Amarillo	Rojo purpura	Rojo purpura
	Color de las brácteas del involucreo	verde	verde	Purpura verdoso	Purpura verdoso
	Color del perigonio	Blanco	Blanco	Purpura claro	Purpura
	Color venas de lóbulos de perigonio	Pardo amarillento	Pardo amarillento	Rojo purpura	Rojo purpura
	Color estigma	Blanco amarillento	Blanco amarillento	Purpura claro	Purpura
Raíz	Color externo de la corteza de la Raíz reserv.	Gris anaranjado claro	Gris anaranjado claro	Pardo amarillento	Blanco
	Color de la pulpa de la raíz reserv.	Blanco	Blanco	Amarillo anaranjado	Blanco
		02HUAQUI, 03HUACHU, 04HUACHU, 05HUACHU, 06HUACHU, 09YRWPAM, 10HUASMV, 11HUASPC, 12HUASPC,	07HUASMV 08HUASMV 13HUAQUI 21MARHUA 22YRWAPO 23HUAMAL 20HCYPIN	14PCHPA 19PCHPA 01HUACHI	15MAHUA



Figura 13. Morfotipo 1: (a) hoja sub cordada. (b) flor blanca. (c) pulpa blanca



Figura 14. Morfotipo 2: (a) hoja cuneada. (b) flor blanca. (c) pulpa blanca



Figura 15. Morfotipo 3: (a) hoja cuneada. (b) flor purpura claro. (c) pulpa amarillo anaranjado.



Figura 16. Morfotipo 4: (a) hoja cordada. (b) flor purpura.

4.1.3. Evaluación agrofenológica

Los resultados que presentamos en este aspecto son preliminares, pero este nos permitió analizar algunas características agrofenológicas dentro de los morfotipos (Cuadro 11).

a. Peso de raíz por planta.

En las evaluaciones realizadas, las accesiones que alcanzaron mayor peso pertenecen al morfotipo 1 Y morfotipo 3, Y son las siguientes: 10HUASMV (M1), 09YRWPAM (M1), 04HUACHU (M1), 01HUACHI (M3) 1,5 kg, 1,5 kg, 1,3kg, 1,3 kg respectivamente. Y estaban en un intervalo de peso de 0,4 kg (15MARHUA) peso mínimo y a 1,5 kg (10HUASMV) peso máximo.

b. Numero de raíces reservantes por planta.

Al efectuar el conteo de raíces reservantes, se determinó que las accesiones 06HUACHU(M1), 09YRWPAM(M1), 12HUASPC(M2) alcanzaron el mayor número de raíces, los dos primeros con 9 y el tercero con 8, el menor número de raíces reservantes se encontró en las accesiones

04HUACHU(M1), 11HUASPC(M1), 20HCYPIN(M2), 2IMARHUA(M2), 19PACHPA(M3), todos con 4 raíces reservantes,.

c. Longitud de raíz.

En las mediciones realizadas a las 20 accesiones de los 4 morfotipos se determinó que la accesión 02HUAQUI(M1) alcanzo 0,35 metros dentro de las cultivadas. La accesión silvestre (15MARHUA) alcanzo 1,2 metros de longitud, las longitud de las raíces estaban comprendidas entre 0,18 m (19PACHPA) longitud mínima Y 1.2 m (MARHUA) longitud máxima.

d. Diámetro de raíz.

En cuanto al diámetro, las accesiones que alcanzo el mayor diámetro fueron: 09YRWPAM(M1) con 5 cm y 04HUACHU(M1) con 4,9 cm que pertenecen al morfotipo 1. El diámetro de las accesiones estaban comprendida entre 3 cm (05HUACHU) diámetro mínimo y 5 cm 09YRWPAM(M1) diámetro máximo considerando solo las cultivadas, si consideramos el morfotipo silvestre (15MARHUA) este alcanzo el menor diámetros con 1,4 centímetros.

e. Días de emergencia.

Los días de emergencia de las accesiones de kuyacsa estaban comprendidas entre 15 y 27 días, las accesiones que emergieron en menor tiempo fueron 08HUASMV(M2) y 22YRWAP(O)(M2) en ambos casos en 15 días, las accesiones que demoraron en la emergencia fueron 02HUACHU y 05HUACHU en 27 y 25 días respectivamente.

f. Inicio de botón floral.

Los resultados de inicio de botón floral de las accesiones están comprendidas entre 135 y 249 días, la accesión 22YRWAP(O)(M2) emitió su

botón floral a los 135 días y la accesión 02HUAQUI(M1) a los 249 días. Dentro del morfotipo 1, el 87,5 % de las accesiones su inicio de botón floral estaba comprendido entre 202 y 249 días. En el morfotipo 2 el 75 % de las accesiones el inicio de botón floral estaba comprendida entre 150 días y 200 días y el 25 % floreció a los 204 días. En el morfotipo 3 el 100 % de las accesiones su inicio del botón floral estaba entre 152 y 192 días, la accesión del morfotipo 3 su inicio de botón floral fue a los 115 días.

g. floración.

La floración de las accesiones empezó a los 154 días y terminó a los 266 días. En el morfotipo 1, el 87.5 % de las accesiones la floración se dio a partir de los 223 días y sola una accesión floreció a los 195 días que representa el 12.5 %. En el morfotipo 2, el 50 % de las accesiones florecieron entre 200 a 232 días y el otro 50 % inició a los 154 a 182 días. De la misma manera en el morfotipo 3, el 66,7 % de las accesiones florecieron por encima de los 200 días y el 33.3 % floreció a los 171 días. La accesión silvestre que pertenece al morfotipo 4 floreció a los 138 días

Distribución geográfica.

Se ha utilizado el programa ArGis 10.2 para generar el mapa de distribución de la Kuyacsa en la Región Huánuco (Figura 17). Dentro de cual se puede apreciar los lugares donde se colectó el material vegetal.

Las diferentes figuras geométricas dentro del mapa indican los puntos de colecta de los cuatro morfotipos. La intensidad del color dentro del mapa indica la cantidad de accesiones colectadas por provincia.

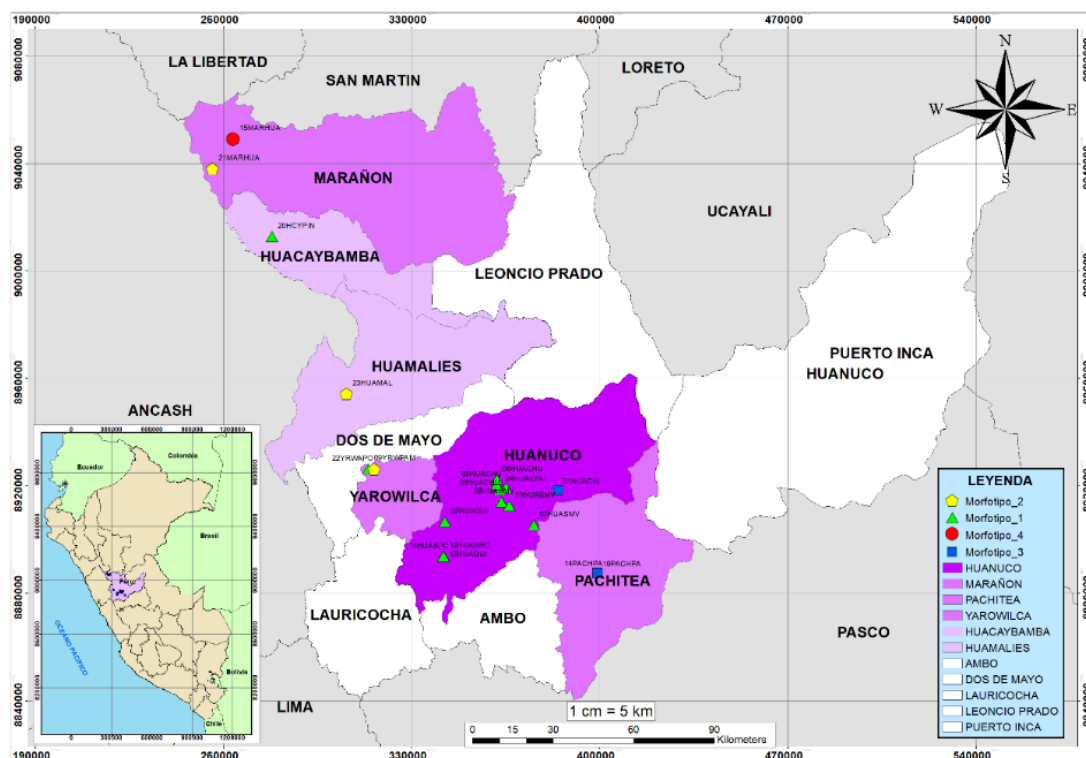


Figura 17. Distribución geográfica de los morfotipos de kuyacsa *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl), de la Región Huánuco.

- **Huacaybamba:** En esta provincia se encontró en el distrito Pinra (Rayan a 2840 msnm), el número de individuos que se encontró es mayor a 10 , la accesión que se encontró en esta provincia pertenece al morfotipo 1.
- **Huamalíes:** el único distrito que se colectó es Chavín de Pariarca (Perla pampa a 3279 msnm), se encontró 2 a 3 individuos, la accesión pertenece al morfotipo 2.
- **Huánuco:** En esta provincia, se colectaron la mayor cantidad de accesiones siendo predominante el morfotipo 1 y una accesión pertenece al morfotipo 3. En el distrito de Acomayo se colectó el morfotipo 3 a 2762 msnm. Dentro de la provincia de Huánuco el distrito de Churubamba presentó mayor cantidad de accesiones que pertenecen al morfotipo 1, los centros poblados son: Rayan pata a 2885 msnm, marag a 3220 msnm,

Shacua a 3414 msnm, Paccha 3082 msnm. En el distrito de Quiqui se colecto dos accesiones que pertenecen al morfotipo 1, estos se encuentran en el centro poblado de Mitotambo (Shogos a 2930 msnm, witco a 2842 msnm). En el distrito San pedro de Chaulan se colectaron 2 accesiones del morfotipo 1 (Gantupata a 3444 msnm e Irapata a 3370 msnm). En Santa María del Valle se colecto 3 accesiones del morfotipo 1 (Santa rosa de Maranvuco a 2817 msnm, Pichuy a 3000 msnm y Ratococha a 3050 msnm).

- **Marañón:** En esta provincia se colecto 2 morfotipos (morfotipo 1 y morfotipo 4) el morfotipo 1 es cultivada y el morfotipo 4 es silvestre esto se encuentra en el distrito de Huacrachuco (Pumachupay a 2994 msnm y Huachumay a 3162 msnm).
- **Pachitea:** En esta provincia se colecto 2 accesiones en el distrito de Panao - Yuracmarca a 3285 msnm y 3300 msnm que pertenecen al morfotipo 3.
- **Yarowilca:** En esta provincia se colecto en los distritos de Pampa Marca (Garu a 3433 msnm) y Aparicio Pomares (Acobamba a 3014 msnm) y que pertenecen al morfotipo 1 y 2 respectivamente.

4.2. Caracterización molecular

4.2.1. Análisis de polimorfismo

Para la elección de los primers, se realizó el screening de 21 primers ISSR y se seleccionó los que dieron mejor respuesta en la pre selección; los que mostraron mayor cantidad de loci polimórfico, La amplificación del ADN de todos los individuos se realizó eligiendo 4 primer de los iniciadores ISSR.

a) Estimación del Índice de Contenido Polimórfico (PIC).

Este índice evalúa la información de un marcador en la población de acuerdo a las frecuencias de los alelos.

La matriz básica de datos donde se trabajó estuvo compuesto por 20 OTUs y 86 alelos, todo esto representan a los alelos amplificados por los 4 primer previamente selecciones, de estos se encontró 63 alelos polimórficos, y el promedio de 15 alelos polimórficos por los cuatro primer, y un promedio de 73,86 % de loci polimórfico, los primer con un mayor porcentaje de loci polimórfico fueron IS-36 y UBC 807 con un 100 % y 75 % respectivamente y en un intervalo de 33 % a 100 %.

El PIC fue calculado para cada iniciador, el promedio de información polimórfica para las accesiones evaluadas fue, 0,22 con rangos de 0,17 a 0,37 donde el marcador IS-36 y UBC 859 presentaron un mayor poder discriminatorio con un índice de 0,37 y 0,28 respectivamente (cuadro 08).

Cuadro 08. Índice de contenido polimórfico de las 20 accesiones de kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl)

Primer	Secuencia 5´- 3´	Total loci	Loci polimórfica		PIC
			Nº	%P	
UBC 859	TGT GTG TGT GTG TGT GRC	28	21	75	0,28
UBC 807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	22	20	91	0,17
IS-36	AGA GAG AGA GAG AGA GTC	15	15	100	0,37
SSR4	BDB CAC ACA CAC ACA	21	7	33	0,07
TOTAL		86	63		
x̄		21,5	15,75	74,75	0,22

4.2.2. Análisis de conglomerado

El análisis clúster del Algoritmo UPGMA a distancia de concordancia simple de 20 accesiones (figura 18) dio como resultado agrupamientos similares a Coeficiente SMC (Simple Matching Coeficient) de 0,89 cercano a 1 (máxima similitud) se observa 18 grupos, esto nos indica que el 20 % de accesiones posibles duplicadas en el jardín de colecta 19PACHPA=20HCYPIN, 08HUASMV=09YRWPAM.

A una distancia de similitud de 0,75 de similitud con el coeficiente SMC (Simple Matching Coeficient), se puede ver 7 grupos, los cuales están formados por:

El primer bloque estaría integrado por el Grupo 01 (G1) formado por la accesión 01HUACHI que se une a una distancia de 0,60. El grupo 2 (G2) formada por las accesiones **02HUAQUI**, **07HUASMV**, **04HUACHU**, 19PACHPA, 20HCYPIN y MARHUA que se une a una distancia de 0,74,. Grupo 3 (G3), formado por la accesión 23HUAMAL que se une a una distancia de 0,74. Grupo 4 (G4), formado por las accesiones **03HUACHU**, **05HUACHU** y **10HUASMV** que se une a una distancia de 0,73. Grupo 5 (G5), formado por las accesiones **06HUACHU**, **11HUASPC**, **12HUASPC**, **08HUASMV**, 09YRWPAM, **13HUAQUI** y 14PACHPA que se une a una distancia de 0,705, Grupo 6 (G6), formado por la accesión 22YRWAP0 que se une a una distancia de 0,69. Grupo 7 (G7), formado por la accesión 22YRWAP0 que se une a una distancia de 0,69. Grupo 8 (G8), formado por la accesión 15MARHUA que se une a una distancia de 0,41.

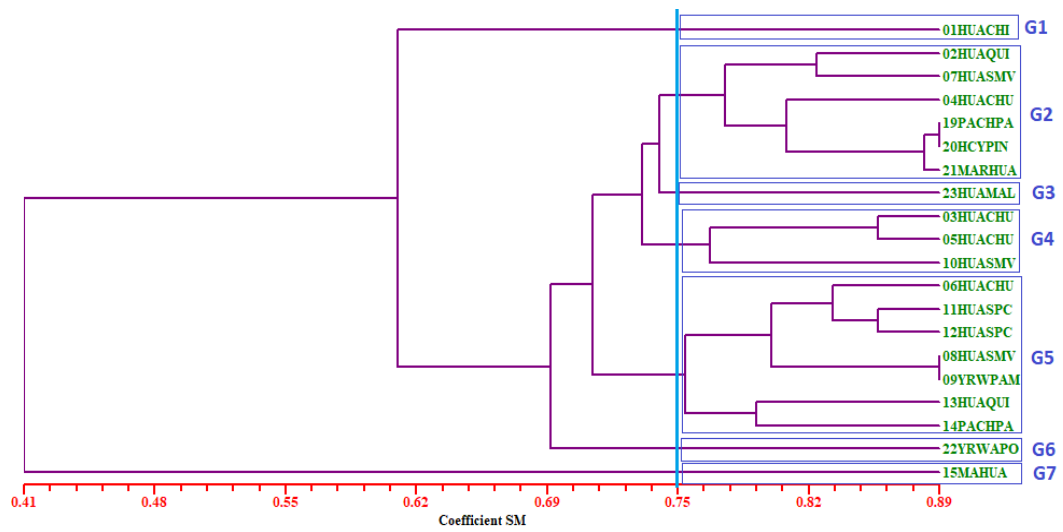


Figura 18. Dendrograma de distancia entre las accesiones de Kuyacsa (*Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl) Punto de corte 0,75.

V. DISCUSIÓN

5.1. Caracterización morfológica

La muestra conformada por 20 individuos, estaba comprendido por accesiones de flor blanca y púrpura de diferentes orígenes, dentro de esto estaban 19 cultivadas y 1 silvestre. El número de individuos por muestra es pequeña, como máximo se tenía 10 individuos, por la escasa existencia de poblaciones en la región. La siembra se realizó en los meses octubre y noviembre a medida que se iba realizando la colecta.

A diferencia de los morfotipos definidos por Seminario J y Valderrama M (2012), donde ellos generan 5 morfotipos, en la presente investigación se generaron 4 grupos. Dentro de estos 4 grupos el Morfotipo 1 con el morfotipo III de Seminario J (2012) son los únicos que guardan una alta similitud en su características morfológicas, mientras el morfotipo 3 y el morfotipo IV son similares por las características de hoja con excepción forma de base, las características de flor y raíz son similares entre estos morfotipos, Seminario (2012) indica que este último procede de Puno y esto mismo indica Gendall (2017), pero seminario no indica en su investigación la característica del color de la corteza del tallo subterráneo, pero Gendall (2017) manifiesta que la característica de esta entrada procedente Puno tiene el color de la corteza del tallo subterráneo de color magenta , lo cual indica que estos morfotipos son diferentes. Los morfotipos 2 y morfotipo 4 son diferentes a los encontrados por Seminario (2012). Las descripciones morfológicas realizadas por Gendall (2017) a las plantas de kuyacsa encontradas en la Región Huánuco coincide solo el morfotipo de flor blanca, más no el de flor púrpura.

En la caracterización morfológica que hizo Morillo (1998) determino 2 morfotipos y 7 subgrupos : morfotipo blanco, de hábito decumbente, tallo

verde amarillo o verde oscuro, hoja verde grisáceo y flor blanca, raíces de color crema o crema amarillo, pulpa amarillo o blanco todas estas características coinciden con los morfotipos de flor blanca (morfotipo 1 y morfotipo 2), mientras el morfotipo violeta, de hábito muy decumbente, tallo violeta, hoja verde oscura con pigmentos púrpuras y flor magenta, Raíces de color crema o amarillento y pulpa blanca no coinciden con ninguno de los morfotipos de flor púrpura, el morfotipo 3 se diferencian por el color de tallo y por el color de pulpa de la raíz reservante y con el morfotipo 4, por el hábito de crecimiento y color externo de la raíz.

La variación morfológica observada entre las accesiones colectadas y caracterizadas de la Región Huánuco, nos indican que existe diversidad genética en esta raíz con potencialidad agronómica, medicinal y alimenticia.

Los tres primeros componentes contribuyeron con el 97,94 % de la variación de los 17 caracteres y que el primero CP explica la mayor parte de la variación (74,92 por ciento). Este componente principal está asociado a características altamente discriminantes e identificables en campo y ordeno accesiones según los caracteres de: (5 de flor, 3 de tallo, 3 de raíz, 2 de hoja y 1 de follaje). El componente 2 (CP2) explicó el 13,59 % de la variación y ordeno accesiones por 2 caracteres de hoja.

Distribución geográfica.

De las 9 provincias que conforman la parte sierra de la Región Huánuco, no se encontraron plantas de kuyacsa en las provincias de Dos de Mayo, Ambo y Lauricocha, esto se podría deber al desplazamiento por otros cultivos comerciales o variedades mejoradas, también porque no se consume. Los pobladores de esas zonas, refieren no conocer ni haber visto alguna vez en su vida. Esto nos indica que es necesario recorrer con más detenimiento cada una de estas provincias para recobrar alguna información de personas

mayores y comprobar si es que en verdad no hubo nunca o cuando se desapareció. Solamente en la provincia de Lauricocha, refirió un anciano conocer una historia sobre el origen de su nombre, contando una pequeña historia sobre un romance entre una nativa de la zona y un joven que venía de la provincia vecina de Huaraz, y que él había traído esta raíz como un presente para ella. A diferencia de lo colectado por Hendall en el año 2016, donde ella identificó a 13 personas que cultivaban kuyacsa en 6 distritos de la Región Huánuco, que corresponden a las provincias de Huánuco en su mayoría y una en la Provincia de Huamalies; nosotros no solo colectamos más número de accesiones (20), sino también recorrimos mayor número de provincias que ella y ubicamos una planta silvestre. Al igual de lo registrado por Gendall (2017), sobre la mayor distribución del cultivo de kuyacsa en la provincia de Huánuco, nosotros también ratificamos lo mismo pero en mayor cantidad. Esto nos indica que se debe explorar con mayor cuidado y en otros lugares de la provincia de Huánuco la presencia de esta raíz. Pero también es necesario notar que el número de plantas encontradas en esta provincia fue muy reducido, diría de sobrevivencia en algunos casos. El rango altitudinal (2300 – 3500 msnm) donde se cultiva la kuyacsa, que refieren Seminario, J. *et al* y Gendall (2017), se observó en este trabajo que las plantas cultivadas en Huánuco se ubican en altitudes mayores a 2,700 msnm y por debajo de los 3,500; eso nos indica que es posible encontrar a mayores altitudes que las señaladas por los autores arriba indicados, debido muy probablemente al incremento de la temperatura en el planeta y la tendencia de subir los cultivos cada vez más.

5.2. Caracterización molecular

En el **cuadro 09** indica los promedios de iniciador ISSR más informativo, los cuales son, el IS-36 (PIC=0,37), seguido por UBC 859 (PIC =0,28), UBC 807 (PIC = 0,17) Y SSR4 (PIC=0,07). En el **cuadro 12, cuadro**

13 y cuadro 14 se aprecia la suma de los iniciador que detectaron mayor cantidad de loci polimórfico, el UBC 859 (PIC = 7,75), UBC 807 (PIC=3,745), IS-36 (PIC = 5,495), SSR4 (PIC=1,56), Los iniciadores ISSR de mayor índice de contenido polimórfico son mayores a los obtenidos por Chía (2006) quien trabajo en kuyacsa con marcador RAPD OPA01(PIC=0,66), OPA03(PIC=1,46), OPA04(PIC=2,34), OPA07(PIC=1,10), OPA08(PIC=0,72), OPA09(PIC=2,15), OPA10(PIC=0,41), OPA13(PIC=2,03), OPA20(PIC=0,55)., ambos marcadores son dominantes. Cubero (2013) indica que el número de polimorfismo a que da lugar los marcador microsatelitales es, pues, muy elevada, con ventaja sobre RAPD Y AFLP.

Del análisis molecular y del clúster de datos que generó el dendograma, para las accesiones estudiadas de la Región Huánuco, entre los posibles duplicados encontrados a un índice de similitud de 0,89 son las entradas 19PACHPA=20HCYPIN, 08HUASMV=09YRWPAM, ningunos pertenece al mismo grupo morfológico (Cuadro 07).el resto de las entradas se agrupan individualmente.

Aun índice de similitud de 0,75, se obtuvo siete grupos, que es casi el doble de lo obtenido en la caracterización morfológica, lo que sugiere que probablemente exista una mayor variación a nivel molecular, en varios casos no comparten características morfológicas. las entradas 02HUAQUI, 03HUACHU, 04HUACHU, 05HUACHU, 06HUACHU, 09YRWPAM, 10HUASMV, 11HUASPC, 12HUASPC, pertenecen a un mismo morfotipo, pero a nivel molecular presentan variabilidad. Lo mismo ocurre en las entradas 07HUASMV, 08HUASMV, 13HUAQUI, 21MARHUA, 22YRWAP0, 23HUAMAL, 20HCYPIN del morfotipo 2, todas estas accesiones antes mencionadas están integrando los diferentes clúster dentro del dendograma (Figura 12). Resultados similares obtuvo Chía (2006).

La accesión 01HUACHI, 14PSCHPA y 19PACHPA pertenecen al morfotipo 3, y la características morfológica que discrimina del resto es el color de la flor (color purpura), estos se agrupan con el morfotipo 1 y morfotipo 2, excepto la accesión 01HUACHI no pertenece a ningún clúster. La entrada silvestre 15MARHUA no pertenece a ningún clúster, esto mismo ocurre en la caracterización morfológica, con esta disimilitud genética se puede suponer que pertenece a una de las especies del género *Mirabilis* diferente al de *Mirabilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl.

Se observó en todos los grupos al menos una accesión que procedía de la provincia de Huánuco. Debido a eso no hay una clara diferenciación en grupos definidos por origen. Esto quizá está definido por la baja diversidad alélica entre accesiones evaluadas o la proximidad geográfica que permiten la movilización de semillas de un lugar a otro por el distanciamiento corto que se encuentran algunas provincias.

Estos resultados de agrupamiento indican que los marcadores ISSR es un marcador molecular cuyas secuencias objetivas que están generalmente en zonas neutrales de evolución. Es decir, secuencias que no codifican o regulan la expresión genética o regulan la expresión genética de un carácter fenotípica, el color de flor y otros.

VI. CONCLUSIONES

- 1) Los tres primeros componentes principales explicaron el 97,94 % de la variación, los caracteres que más aportaron al primer componente fueron, uno de follaje, tres de tallo, dos de hoja, 5 de flor y tres de raíz, al segundo componente, dos caracteres de hoja y al tercero un carácter de hoja
- 2) La aplicación de los marcadores moleculares ISSR en la caracterización molecular se logró determinar el nivel de diversidad molecular existente en la Región Huánuco de poblaciones de Kuyacsa , utilizando el coeficiente de similitud Concordancia Simple (SM)
- 3) El resultado de la caracterización molecular indica que, existe diversidad interregional significativa, probablemente por la reproducción sexual de la especie y la presencia de especies silvestres.
- 4) No se observó correspondencia entre los datos de la caracterización morfológica y los datos de la caracterización molecular (marcadores ISSR).
- 5) Las mayores poblaciones de plantas cultivadas de kuyacsa se ubican en la provincia de Huacaybamba, pero la mayor dispersión se encuentra en los diferentes distritos de la provincia de Huánuco.
- 6) Un jardín de colecta con datos de pasaporte y accesiones caracterizadas, facilita el acceso al material vegetal de kuyacsa para realizar diversos trabajos de investigación.

VII. RECOMENDACIONES

- 1) Si se quiere evaluar fases fenológicas, la siembra de las accesiones se deben de realizar a un distanciamiento de 1m entre planta y 1,5 metros entre surco y las evaluaciones se deben de realizar cuando la planta tenga un año de desarrollo.
- 2) La evaluación de los caracteres de hoja debe hacerse cuando la accesión este en plena floración debido a que las planta se encuentra en su máximo desarrollo.
- 3) Para futuros estudios en kuyacsa, sería bueno probar marcadores moleculares diferentes a los ISSR o una mayor cantidad de primer en el caso de marcador ISSR que permitan identificar mayor polimorfismo y obtener resultados consistentes.
- 4) Realiza la caracterización fenotípica por lo menos dos periodos sucesivos para reducir el efecto del ambiente sobre ello y asegurar que los marcadores moleculares y morfológicos tengan una correspondencia entre sí.

VIII. LITERATURA CITADA

Alejos, LP; Aragón, MC; Cornejo, A, s.f. Extracción y purificación de ADN (en línea). México. 25 p. Consultado 01 de set. 2018. Disponible en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones2/libros/710/extraccion.pdf>

Barrera, V; Tapia, C. y Monteros, A. (eds.). 2004. Raíces y Tubérculos Andinos: Alternativas para la conservación y uso sostenible en el Ecuador. Serie: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003). (en línea). Quito, Ecuador - Lima, Perú. 176 p. consultado 17 de ago. 2018. Disponible en <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/documentos/Ra%C3%ADces%20y%20Tub%C3%A9rculos%20Alternativas%20para%20el%20uso%20sostenible%20en%20Ecuador.pdf>

Borgesl, A; Silva, M; Ghenrique, G; Silvall, JR; de Andrade, E; Ann, E. 2009. Métodos CTAB para la extracción de ADN de camote para análisis de microsatélites (en línea) Revista Científica Scielo 66(4). Consultado 6 de set. 2018 disponible en http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010390162009000400015

Chía Wong, JA. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clónales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS - Tingo María. (en línea). Tesis Magister en Biología Molecular. Lima, Perú, UNMSM. Consultado 20 jul. 2018. Disponible en http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/244/Chia_wj.pdf?sequence=1

- Chía, J; López, C; Blas, R; Seminario, J; Mansilla R; Baudoin P. 2006. Diversidad genética molecular de *Mirabilis expansa* mediante RAPD. *Ecología Aplicada* 5. 81-86.
- Chirinos, MC; Jiménez, JE; Vilca, LS. 2015. Análisis de la Variabilidad Genética entre treinta accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet) usando marcadores moleculares ISSR (en línea) *Revista Científica Scielo* 6(1). Consultado 29 de set. de 2018 disponible en http://www.scielo.org.pe/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2077-99172015000100002
- CIP (Centro Internacional de la Papa, Perú). 1998. Producción de Raíces Andinas. Comp. J. Seminario. Proyecto Colaborativo de Conservación y uso de Biodiversidad de Raíces y Tuberosas Andinas (CIP-COSUDE), Manual de Capacitación (CIP). Lima, Perú.
- Crisci, JV; López, MF. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Serie de Biología Monografía N° 26. Secretaria General de la O.E.A. Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Washington, D.C.132p.
- Cubero, JI. 2013. Introducción a la Mejora Genética Vegetal. 3 ed. Madrid, España. 569 p.
- Eguiarte, LE; Souza, V; Aguirre, X (comps). 2007. *Ecología molecular* (en línea) Coayacan, México. 592 p. Consultado 18 de set. de 2018. Disponible en https://www.researchgate.net/profile/Alejandra_Moreno-Letelier/publication/258129643_Ecologia_Molecular/links/0046352715658e2599000000/Ecologia-Molecular.pdf
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura). 2018 conservación de los recursos filogenéticos. (en

línea). Consultado 12 de nov. 2018. Disponible en <http://www.fao.org/agriculture/crops/mapa-tematica-del-sitio/theme/seeds-pgr/conservation/es/>

Franco, S. y Uceda, J. 1991. El chago o yuca inca (*Mirabilis expansa*) raíz andina en peligro de extinción. Estación Experimental Agropecuaria y Forestal Baños del Inca, INIAA, Cajamarca.

Franco, TL; Hidalgo. 2003. Análisis Estadístico de Datos de Caracterización Morfológica de Recursos Filogenéticos. (en línea) Boletín técnico n°.8, Instituto Internacional de Recursos Filogenéticos (IPGRI), Cali, Colombia. 89 p. consultado 21 de Ago. 2019 disponible en https://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/An%C3%A1lisis_estad%C3%ADstico_de_datos_de_caracterizaci%C3%B3n_morfol%C3%B3gica_de_recursos_fitogen%C3%A9ticos_894.pdf

García, LC. 2012. Caracterización morfológica y molecular de 34 colectas nativas de jitomate (*Solanum lycopersicum* L.) (en línea). Tesis maestría en biotecnología vegetal. Chapingo, México, UNCh. Consultado 22 de set. de 2018. Disponible en <https://chapingo.mx/horticultura/pdf/tesis/TESISMIBA2012070508126271.pdf>

Gendall, H. 2017. Biocultural diversity conservation and the case of the “lost” andean crop (*Mirabilis expansa*) (Ruiz y Pav.) Standley). Tesis de Maestría, Universidad de Copenhagen Dinamarca.

Hartl, D; Jones, E. 2009. Genética: Análisis de genes y genomas. 7 ed. Bartlett Editores, Canadá

- Hidalgo, R. 2003. Variabilidad genética y caracterización de especies vegetales. En: T. Franco y R. Hidalgo (eds.). Análisis estadístico de datos de caracterización morfológica de recursos filogenéticos. Boletín técnico n° 8, IPGRI, Roma, Italia. 2-26 p.
- López, A; Hidalgo, D. 1994. Análisis de componentes principales y análisis factorial. En: Ato, M. y López, J. J. (eds.). Fundamentos de estadística con Systat. Addison Wesley Iberoamericana. p. 457-503.
- Morillo L. 1998. Análisis de polimorfismo en las colecciones de jícama (*Polymnia sonchifolia* P&E) y miso (*Mirabilis expansa* R. & P.) del banco de germoplasma de INIAP. (en línea) Tesis Licenciado Ciencias Biológicas. Pontificia Universidad Católica del Ecuador. Quito, Ecuador. Consultado 25 de Ago. 2019 disponible en https://books.google.com.pe/books?id=LIAzQAAMAAJ&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false.
- Rea, J. 1982. El Miso: Una contribución de la agricultura Pre-Inca de Ecuador y Bolivia. Desde El Surco 23–26.
- Rea, J; León, J. 1965. La Mauka (*Mirabilis expansa* Ruíz & Pavón), un aporte de la agricultura andina prehispánica de Bolivia. An. Científicos 3, 38 – 41.
- Reddy, MP; Sarla, N; Siddiq, EA. 2002. Polimorfismo de repetición de secuencia inter simple (ISSR) y su aplicación en fitomejoramiento. *Euphytica* .128(1), 9 - 17. <http://doi.org/10.1023/A:1020691618797>
- Roca Infante, LA. 2015. Análisis de la diversidad genética de papas nativas de la zona suroeste del departamento de Junín mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites. (en línea). Tesis Biólogo. Lima,

Perú, UNALM. Consultado 20 jul. 2018. Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1885/F30.R623-T.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Rodríguez, AK. 2016. Asociación de marcadores morfológicos y moleculares ISTR y SSR con heterosis en generaciones F1 y F2 de maíz (*Zea mays* L.). (en línea). Maestro en Ciencias en Biosistemática y Manejo de Recursos Naturales y Agrícolas. Jalisco, México, UDG. Consultado 21 de set. de 2018. Disponible en http://biblioteca.cucba.udg.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/5945/Rodriguez_Ponce_Ana_Karen.pdf?sequence=1

Rojas, W; Pinto, M; Alanoca, C; Gómez, L; León, P; Alercia, A; Diulgheroff, S; Padulosi, S; Bazile, D. 2014. Estado de la conservación ex situ de los recursos genéticos de quinua. Capítulo Numero 1.5. "Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013": FAO (Santiago de Chile) y CIRAD, (Montpellier, Francia): pp. 65-94.

Saad, MS; Rao, VR. 2001. Establecimiento y gestión de Campo de banco de genes, un Manual de Capacitación. IPGRI - Asia, el Pacífico y Oceanía, Serdang. Malasia.

Selkoe, K; Toonen, R. 2006. Microsatélites para ecólogos: una guía práctica para usar y evaluadores de microsatélites. *Cartas de Ecología* 9(5): 615-29.

Seminario, J. 2004. Raíces Andinas, Contribución al conocimiento y a la capacitación. VI. Aspectos etnobotánicas y productivos del chago miso o mauka. (*Mirabilis expansa*) (Ruiz y Pav.) Standley). Universidad Nacional de Cajamarca.

- Seminario, J. y Valderrama M. 2012. Variabilidad morfológica y evaluación agronómica de mauka *Mirabilis expansa* (Ruiz y Pav.) Standl. Del norte peruano. Rev. Perú. Biol. 19: 249-256.
- Soto, JV. 2006. Análisis de la diversidad genética de papa nativa (*Solanum sp.*) de los departamentos de Ayacucho, Cajamarca, Cusco, Huancavelica y Puno – Perú, mediante el uso de marcadores moleculares microsatelitales (en línea). Tesis Biólogo. Lima, Perú, UNMSM. Consultado 21 de set. de 2018. Disponible en http://cybertesis.unmsm.edu.pe/bitstream/handle/cybertesis/806/soto_tj.pdf;jsessionid=0B610AFF576814196CEEF296FAA7D01?sequence=1.
- Standley, C. 1931. The Nyctaginaceae and Chenopodiaceae of northwestern South America (en línea). Chicago, EE UU. Consultado 25 de mar. 2019. Disponible en <https://ia902907.us.archive.org/4/items/nyctaginaceaechefistan/nyctaginaceaechefistan.pdf>
- Tamayo, HL. 2010. Caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (quinua) mediante la técnica de ISSR. (en línea) Tesis Magister Scientiae. Lima, Perú, UNALM. Consultado 28 de set. de 2018. Disponible en <http://repositorio.lamolina.edu.pe/bitstream/handle/UNALM/1722/MGP%2009-146-TM.pdf?sequence=1&isAllowed=y>.
- Thome, J.1995. El uso combinado de datos agroecológicos y de caracterización para establecer la colección de núcleos de *Phaseolus vulgaris*. En: Colecciones centrales de recursos filogenéticos Holguín T, Brown and, Hithum tilvan, Morales (eds.). John Wiley and Sons, Nueva York. Páginas. 95-107.

Uribe, LC. 2015. Evaluación preliminar de la diversidad genética de morfotipos de ibia (*Oxalis tuberosa* Mol.) en municipios de Ventaquemada y Turmequé (departamento de Boyacá) por medio de marcadores ISSR. (en línea). Tesis Biólogo. Bogotá, Colombia, PUJ. Consultado 25 de jul. 2018. Disponible en <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/17911/UribeMontesLuciaCarolinaHojitaElvira2015.pdf?sequence=1>

ANEXO

Cuadro 09. Datos de pasaporte de las 19 accesiones de kuyacsa (*Mirabilis expansa* (R & P.) Standley), de la Región Huánuco.

N° del código de la accesión	Localidad	Altitud (msnm)	Latitud	Longitud	Distrito	Provincia	Región
01HUACHI	Mitocucho	2930	9°53'11.60"S	76°26'13.10"O	Quisqui	Huánuco	Huánuco
02HUAQUI	Chacamarca	2762	9°46'43.32"S	76°03'07.16"O	Acomayo	Huánuco	Huánuco
03HUACHU	Rayan pata	2885	9°46'21.90"S	76°13'45.80"O	Churubamba	Huánuco	Huánuco
04HUACHU	Marag	3220	9°47'58.60"S	76°14'55.80"O	Churubamba	Huánuco	Huánuco
05HUACHU	Shacua	3414	9°45'46.70"S	76°15'38.60"O	Churubamba	Huánuco	Huánuco
06HUACHU	Paccha	3082	9°44'41.70"S	76°15'39.50"O	Churubamba	Huánuco	Huánuco
07HUASMV	Santa Rosa	2817	9°53'54.49"S	76°08'07.94"O	Santa María del Valle	Huánuco	Huánuco
08HUASMV	Pichuy	3000	9°49'15.50"S	76°14'42.40"O	Santa María del Valle	Huánuco	Huánuco
09YRWPAM	Garu	3433	9°42'06.08"S	76°13'07.83"O	Pampamarca	Yarowilca	Huánuco
10HUASMV	Ratacocha	3050	9°50'01.47"S	76°13'07.83"O	Santa María del Valle	Huánuco	Huánuco
11HUASPC	Gantupata	3444	10°00'16.10"S	76°26'28.20"O	San Pedro de Chaulan	Huánuco	Huánuco
12HUASPC	Irapata	3370	10°00'12.30"S	76°26'30.80"O	San Pedro de Chaulan	Huánuco	Huánuco
13HUAQUI	Mitocucho	2842	9°53'30.00"S	76°25'40.40"O	Quisqui	Huánuco	Huánuco
14PACHPA	Yuracmarca	3285	10°03'40.30"S	75°55'16.30"O	Panao	Pachitea	Huánuco
15MARHUA	Pumachupay	2994	8°35'47.40"S	77°08'54.00"O	Huacrachuco	Marañón	Huánuco
19PACHPA	Yuracmarca	3300	10°03'43.30"S	75°55'10.80"O	Panao	Pachitea	Huánuco
20HCYPIN	Rayan	2840	8°55'30.45"S	77°01'03.88"O	Pinra	Huacaybamba	Huánuco
21MARHUA	Huachumay	3162	8°41'41.82"S	77°13'07.71"O	Huacrachuco	Marañón	Huánuco
22YRWAPO	Acobamba	3014	9°42'31.24"S	76°40'32.76"O	Aparicio Pomares	Yarowilca	Huánuco
23HUAMAL	Perla pampa	3279	9°27'51.00"S	76°46'23.83"O	Chavín de Pariarca	Huamalies	Huánuco

Fuente: Elaboración propia

Cuadro 10. Descriptor morfológicos para mauka, (*Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl).

	1 verde amarilla 144A
1) Color de follaje	2 verde amarilla 146C, 146A
	3 verde purpúreo 59B, 60A
	1 verde amarillo 144C, 145 ^a
2 Color principal de tallo aéreo	2 verde 143C
	3 rojo purpúreo 59B, 60A
3 Color secundario de tallo aéreo	0 ausente
	1 presente
	1 Blanco
4 Color de tallo subterráneo	2 Amarillo claro 13B
	3 naranja grisáceo 165B
5 Color predominante del haz de la hoja	1 verde amarillento 145A
	2 verde amarillo 146B
	3 verde 146 A
6 Color secundario del haz de la hoja	0 ausente
	1 presente
7 Forma de lamina	1 ovada
	2 cordada
	1 cordada
8 Base de lamina	2 cuneada
	3 Subcordada
9 Ápice de lamina	1 estrechamente agudo
	2 medianamente agudo
	3 ampliamente agudo
10 Color de botón floral	1 amarillo 4A, 5B
	2 pardo amarillento 163B
	3 rojo púrpura 72B

	4 rojo Púrpura 71A
11 Color de las brácteas del involucro	1 verde 146C 3 púrpura verdoso
12 Color del perigonio	1 blanco 155D 2 blanco grisáceo 156D 3 púrpura claro 75B 4 púrpura 78B
13 Color venas de lóbulos de perigonio	1 amarillo 4A 2 Pardo Amarillento 163B 3 rojo Púrpura 71A
14 Color estigma	1 blanco amarillento 158D 2 amarillo anaranjado 20C 3 púrpura claro 75D 4 púrpura 75A
15 Color externo de la corteza de la RR	1 blanco 155D 2 pardo amarillento 161C 3 gris anaranjado claro 164C 4 gris anaranjado 164 A, 165B
16 Color de la corteza de raíz al raspado	1 blanco 155D 2 amarillo 12C 3 amarillo Anaranjado 14B, 13A
17 Color de la pulpa de la raíz reservante	1 blanco 155d 2 blanco Anaranjado 159C 3 amarillo anaranjado 19C, 20C

Fuente: Tomado de Seminario (2012)

Cuadro 11. Promedio de las principales variables cuantitativas en caracterización morfológica de Kuyacsa (*Mirabilis expansa*), agrupadas por morfotipos

Morfotipo	Accesión	Peso de raíces por planta	Número de raíces por planta	Largo de raíz (metros)	Diámetro de raíz (centímetros)	Días de emergencia	Numero de brotes	Inicio de botón floral (Días)	Inicio de Floración (Días)
M1	02HUAQUI	0,80	8	0,35	4,20	23	6	249	266
	03HUACHU	1,20	5	0,19	3,80	27	5	206	221
	04HUACHU	1,30	4	0,2	4,90	19	4	221	238
	05HUACHU	0,90	7	0,22	3,00	25	5	209	227
	06HUACHU	1,00	9	0,23	3,80	24	5	202	224
	09YRWPAM	1,50	9	0,26	5,00	19	5	195	223
	10HUASMV	1,50	8	0,28	3,30	18	4	195	223
	11HUASPC	0,60	4	0,25	4,00	20	5	176	195
M2	07HUASMV	0,90	5	0,21	3,30	16	6	204	232
	08HUASMV	0,85	6	0,21	3,6	15	7	204	232
	12HUASPC	1,00	8	0,23	3,5	18	5	176	200
	13HUAQUI	0,85	6	0,24	4	18	5	189	208
	20HCYPIN	0,90	4	0,23	3,8	18	5	154	175
	21MARHUA	1,00	4	0,22	3,5	17	5	138	178
	22YRWAP0	0,75	5	0,17	3,5	15	4	135	154
	23HUAMAL	0,80	5	0,23	3,6	18	4	156	182
M3	01HUACHI	1,30	5	0,25	3,3	21	5	192	209
	14PACHPA	0,70	5	0,19	3,7	21	4	181	202
	19PACHPA	1,20	4	0,18	3,5	21	4	152	171
M4	15MARHUA	0,40	1	1,20	1,4	17	6	115	138

Cuadro 12. Índice de contenido polimorfo calculados primer UBC 859. Mono = locus monomórfico.

	P= N° de presencia	Q= N° de ausencia	p/n (frecuencia genotípica)	q/n (frecuencia genotípica)	(p/n)2 (frecuencia alélica presencia)	(q/n)2 (frecuencia alélica ausencia)	PIC= 1- [(p/n)2+(q/n)2]	Polimórfico o monomórfico	índice del marcador ISSR
UBC 859 M1	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 859 M2	0	20	0	1	0	1	0	mono	
UBC 859 M3	7	13	0,35	0,65	0,123	0,4225	0,455		
UBC 859 M4	19	1	0,95	0,05	0,903	0,0025	0,095		
UBC 859 M5	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 859 M6	19	1	0,95	0,05	0,903	0,0025	0,095		
UBC 859M7	19	1	0,95	0,05	0,903	0,0025	0,095		
UBC 859 M10	10	10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5		
UBC 859 M9	11	9	0,55	0,45	0,303	0,2025	0,495		
UBC 859 M10	7	13	0,35	0,65	0,123	0,4225	0,455		
UBC 859 M11	8	12	0,4	0,6	0,16	0,36	0,48		
UBC 859 M12	12	8	0,6	0,4	0,36	0,16	0,48		
UBC 859 M13	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 859 M14	10	10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5		7,75
UBC 859 M15	11	9	0,55	0,45	0,303	0,2025	0,495		
UBC 859 M16	14	6	0,7	0,3	0,49	0,09	0,42		
UBC 859 M17	11	9	0,55	0,45	0,303	0,2025	0,495		
UBC 859 M18	1	19	0,05	0,95	0,003	0,9025	0,095		
UBC 859 M19	9	11	0,45	0,55	0,203	0,3025	0,495		
UBC 859 M20	11	9	0,55	0,45	0,303	0,2025	0,495		
UBC 859 M21	19	1	0,95	0,05	0,903	0,0025	0,095		
UBC 859 M22	19	1	0,95	0,05	0,903	0,0025	0,095		
UBC 859 M23	8	12	0,4	0,6	0,16	0,36	0,48		
UBC 859 M24	7	13	0,35	0,65	0,123	0,4225	0,455		
UBC 859M25	8	12	0,4	0,6	0,16	0,36	0,48		
UBC 859M26	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 859 M27	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 859 M28	0	20	0	1	0	1	0	mono	

Cuadro 13. Índice de contenido polimorfo calculados, primer UBC 807. Mono = locus monomórfico.

	P= N° de presencia	Q= N° de ausencia	p/n (frecuencia genotípica)	q/n (frecuencia genotípica)	(p/n) ² (frecuencia alélica presencia)	(q/n) ² (frecuencia alélica ausencia)	PIC= 1-[(p/n) ² +(q/n) ²]	Polimórfico o monomórfico	Índice del marcador ISSR
UBC 807 M1	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC 807 M2	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC 807 M3	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC807 M4	17	3	0,85	0,15	0,723	0,023	0,255		
UBC 807 M5	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
UBC 807 M6	16	4	0,8	0,2	0,64	0,04	0,32		
UBC 807 M7	16	4	0,8	0,2	0,64	0,04	0,32		
UBC 807 M8	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC 807 M9	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
UBC 807 M10	6	14	0,3	0,7	0,09	0,49	0,42		
UBC 807 M11	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
UBC 807 M12	0	20	0	1	0	1	0	mono	3,745
UBC 807 M13	20	0	1	0	1	0	0	mono	
UBC 807 M14	3	17	0,15	0,85	0,023	0,723	0,255		
UBC 807 M15	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
UBC 807 M16	14	6	0,7	0,3	0,49	0,09	0,42		
UBC 807 M17	19	1	0,95	0,05	0,03	0,003	0,095		
UBC 807 M18	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC 807 M19	18	1	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
UBC 807 M20	1	9	0,05	0,95	0,003	0,903	0,095		
UBC 807 M21	19	0	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		
UBC 807 M22	19	1	0,95	0,05	0,903	0,003	0,095		

Cuadro 14. Índice de contenido polimorfo calculados, primer IS-36 y SSR4. Mono = locus monomórfico.

	P= N° de presencia	Q= N° de ausencia	p/n (frecuencia genotípica)	q/n (frecuencia genotípica)	(p/n) ² (frecuencia alélica presencia)	(q/n) ² (frecuencia alélica ausencia)	PIC= 1- [(p/n) ² +(q/n) ²]	Polimórfico o monomórfico	índice del marcador ISSR
IS-36 M1	4	16	0,2	0,8	0,04	0,64	0,32		
IS-36 M2	9	11	0,45	0,55	0,2025	0,3025	0,495		
IS-36 M3	12	8	0,6	0,4	0,36	0,16	0,48		
IS-36 M4	16	4	0,8	0,2	0,64	0,04	0,32		
IS-36 M5	15	5	0,75	0,25	0,5625	0,0625	0,375		
IS-36 M6	11	9	0,55	0,45	0,3025	0,2025	0,495		
IS-36 M7	2	18	0,1	0,9	0,01	0,81	0,18		
IS-36 M8	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		5,495
IS-36 M9	5	15	0,25	0,75	0,0625	0,5625	0,375		
IS-36 M10	16	4	0,8	0,2	0,64	0,04	0,32		
IS-36 M11	10	10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5		
IS-36 M12	9	11	0,45	0,55	0,2025	0,3025	0,495		
IS-36 M13	16	4	0,8	0,2	0,64	0,04	0,32		
IS-36 M14	4	16	0,2	0,8	0,04	0,64	0,32		
IS-36 M15	4	16	0,2	0,8	0,04	0,64	0,32		
SSR4 M1	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M2	10	10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5		
SSR4 M3	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M4	1	19	0,05	0,95	0,0025	0,9025	0,095		
SSR4 M5	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M6	1	19	0,05	0,95	0,0025	0,9025	0,095		
SSR4 M7	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M8	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M9	10	10	0,5	0,5	0,25	0,25	0,5		
SSR4 M10	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M11	20	0	1	0	1	0	0	mono	1,56
SSR4 M12	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M13	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M14	18	2	0,9	0,1	0,81	0,01	0,18		
SSR4 M15	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M16	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M17	19	1	0,95	0,05	0,9025	0,0025	0,095		
SSR4 M18	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M19	1	19	0,05	0,95	0,0025	0,9025	0,095		
SSR4 M20	20	0	1	0	1	0	0	mono	
SSR4 M21	20	0	1	0	1	0	0	mono	

PANEL FOTOGRÁFICO



Figura 19. Roturación y mullido



Figura 20. Surcado

Figura 21. Preparación de propágulos de Kuyacsa (*Mirbilis expansa* [Ruiz y Pav.] Standl)



Figura 22. Siembra



Figura 23. Aporque y desmalezado.

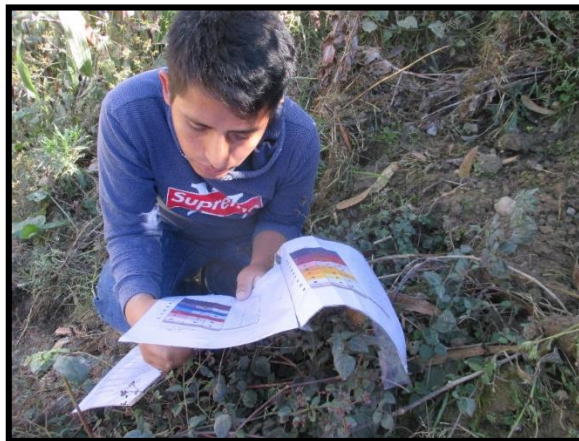


Figura 24. Caracterización morfológica con la cartilla de colores.



Figura 25. Colecta de muestras para extracción de ADN.



Figura 26. Extracción de ADN.



Figura 27. Determinación de la calidad del ADN en electroforesis horizontal.

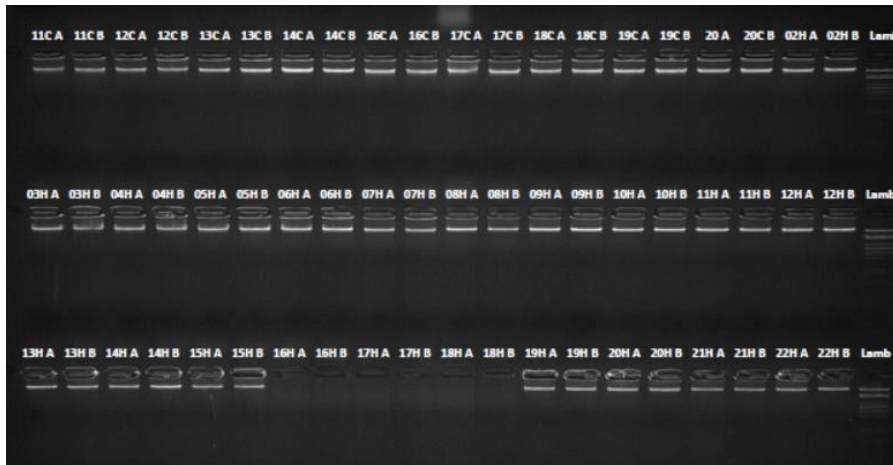


Figura 28. Calidad de ADN

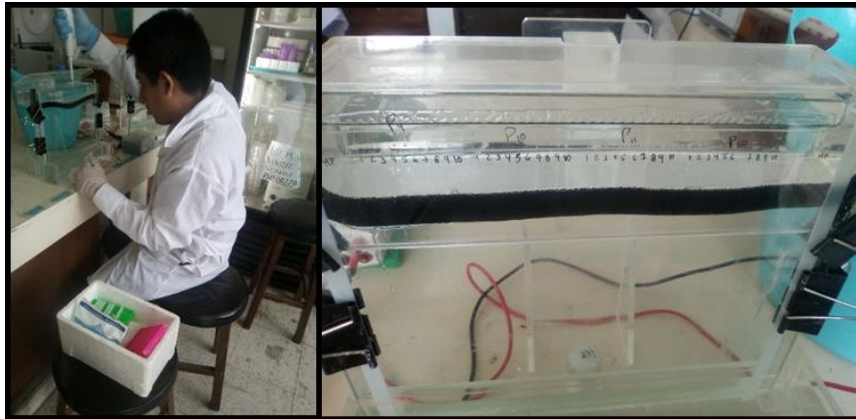


Figura 29. Corrida de las muestras en gel de poliacrilamida.

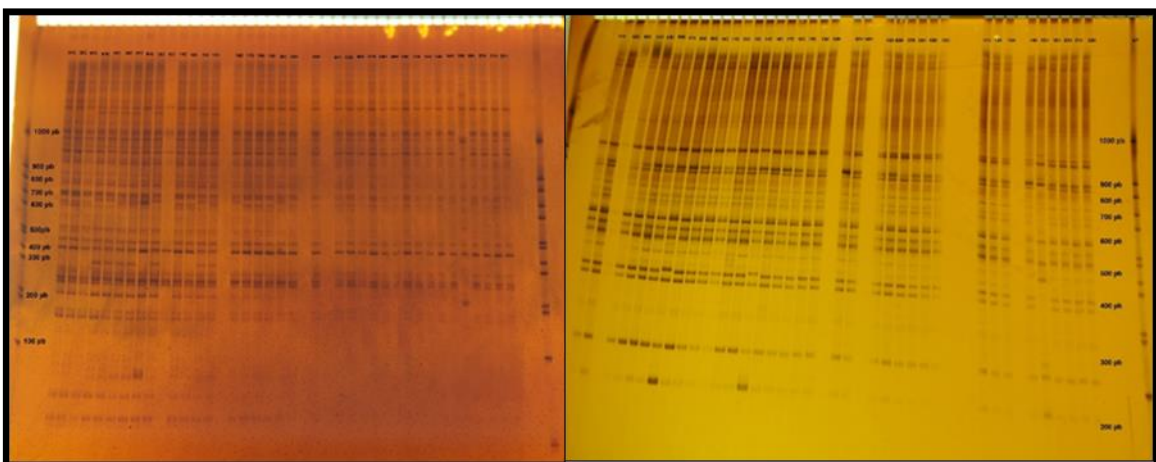


Figura 30. Electroforesis en gel de poliacrilamida demostrando los patrones de amplificación de 2 primers ISSR (UBC 859 Y UBC 807)