

T.153

T.153

53021



+

Universidad Nacional de Río Cuarto

Facultad de Ciencias Exactas Físico-Químicas y Naturales

**"Caracterización de genotipos mejorados de
Amaranthus mediante RAPDs y AFLPs."**

Trabajo de tesis para optar al grado de Magister en Biotecnología.

Tesista: Ing. Agr. Débora Puecher.

Director: M.Sc. Miguel Di Renzo.

Asesores: Lic. Claudio Robredo y M.Sc. Daniel Díaz.

NO SE PRESTA

2000

Lugar de trabajo: Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CNIA-INTA, Castelar.



Agradecimientos

Este trabajo fue posible realizarse gracias al financiamiento de las siguientes instituciones: Instituto de Genética "Ewald A. Favret" CNIA-INTA Castelar, por la Universidad Nacional de Río Cuarto y por el Consejo de Investigaciones Científicas y Tecnológicas de la Provincia de Córdoba.

RESUMEN

El propósito de esta tesis fue caracterizar 4 cultivares y 16 líneas experimentales de amarantos graníferos cultivados, pertenecientes a las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. mantegazzianus*. Para lograrlo se desarrollaron marcadores moleculares RAPDs (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar) y AFLPs (Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos Amplificados).

La capacidad de análisis que tuvieron los marcadores se determinó por la evaluación del índice de contenido polimórfico, el cociente múltiple y el establecimiento de las relaciones genéticas en las 20 entradas. Ambos marcadores obtuvieron un índice de contenido polimórfico similar mientras que, los marcadores AFLPs poseyeron el mayor cociente múltiple. Las relaciones genéticas entre las distintas entradas, establecidas con ambos marcadores por los índices de Jaccard y Nei & Li, estuvieron altamente correlacionadas, indicando congruencia entre la información otorgada por los dos sistemas. Sin embargo, los marcadores RAPDs demostraron una mejor correspondencia con las relaciones inter-específicas establecidas previamente por caracteres morfológicos. Las similitudes genéticas entre entradas de cada especie fueron entre 0,90 y 0,99 con ambos tipos de marcadores, lo que sugiere un elevado grado de homología genética entre estos materiales cultivados.

Por la combinación de distintos loci moleculares derivados de ambas técnicas se logró establecer patrones de *fingerprinting* para todas las entradas analizadas. En este caso, los marcadores AFLPs fueron más informativos debido a un mayor número de loci entrada-específicos.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que, los marcadores RAPDs y AFLPs pueden utilizarse como información complementaria a la morfológica para la caracterización, conservación y utilización de estos y otros materiales del germoplasma de amaranto.

ABSTRACT

The aim of this thesis was to characterize 4 cultivars and 16 experimental lines from cultivated grain amaranths, all of them belonging to *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* and *A. mantegazzianus* species. To obtain them, molecular markers from RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA) and AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms) were developed.

The capacity of analysis from these markers had determined by evaluating the polymorphic content index, the multiplex ratio and the establishment of the genetic relationships among the 20 accessions. Both markers obtained a similar efficiency of polymorphism detection, whereas the AFLP markers had a higher multiplex ratio. The genetic relationships among different accessions, established with both markers by the Jaccard and Nei & Li indices, were highly correlated, indicating congruence between the information obtained from the two systems. However, RAPD markers showed a better correspondence with the inter-specific relationships previously established with morphological characters. The genetic relationships among accessions from each species were 0.90 to 0.99 with both set of markers, which suggests a high degree of genetic homology among these cultivated materials.

It was possible to establish fingerprinting for all the analyzed accessions with the combination of different molecular loci, derived from both techniques. In this case, AFLPs markers were more informative than RAPDs because of the higher number of accession-specific loci.

In accordance with the obtained results, it can be concluded that RAPDs and AFLPs markers can be used as complementary information to the morphological data to the characterization, conservation and utilization from these and other amaranth germplasm materials.

ÍNDICE

Índice de Contenidos:

	página
Agradecimientos	2
Resumen	3
Abstract	4
1 - Introducción	10
1.1 - Origen, Historia y Distribución	10
1.2 - Morfología, Biología reproductiva y Citología	12
1.3 - Fisiología e Importancia del cultivo	15
1.4 - Clasificación, Taxonomía y Diversidad genética	18
1.5 - Marcadores moleculares RAPDs (Random-Amplified-Polymorphic-DNA)	21
1.6 - Marcadores moleculares AFLPs (Amplified-Fragment-Length-Polymorphisms)	23
1.7 - Sistema de Protección y Control de semillas en la Argentina	24
1.8 - Caracterización e Identificación de nuevas líneas y cultivares	26
2 - Objetivos	29
3 - Materiales y Métodos	30
3.1 - Germoplasma	30
3.2 - Material Vegetal	31
3.2.a - Cosecha y liofilización de las muestras para la posterior extracción de ADN	32
3.2.b - Cosecha y extracción inmediata de ADN	33
3.3 - Métodos de extracción de ADN total	33
3.3.a - Método A	33
3.3.b - Método B	35
3.3.c - Método C	36
3.4 - Cuantificación del ADN	38
3.5 - Reacción de RAPDs	40
3.6 - Reacción de AFLPs	42
3.7 - Interpretación del perfil de bandas y Análisis de los datos	54

3.7.1 - Características y Codificación de las bandas	55
3.7.2 - Determinación de las relaciones genéticas	55
3.7.3 - Identificación	59
4 - Resultados y Discusión	61
4.1 - Extracción de ADN total	61
4.2 - Reacción de amplificación de RAPDs	63
4.3 - Variación intra-poblacional evaluada con marcadores RAPDs	69
4.4 - Variación inter-poblacional evaluada con marcadores RAPDs	72
4.5 - <i>Fingerprinting</i> con marcadores RAPDs	84
4.6 - Reacción de amplificación de AFLPs	89
4.7 - Variación inter-poblacional de los marcadores AFLPs	91
4.8 - <i>Fingerprinting</i> con marcadores AFLPs	99
4.9 - Comparación entre la información obtenida por los marcadores RAPDs y AFLPs	105
4.9.a - Variación inter-poblacional	105
4.9.b - Patrones de <i>Fingerprintings</i>	116
4.10 - Antecedentes sobre <i>Fingerprinting</i> por caracteres isoenzimáticos	120
4.11 - Variación inter-poblacional de los marcadores RAPDs y AFLPs	122
5 - Conclusiones	128
Anexo 4.4.1 Matriz básica de marcadores RAPDs	130
Anexo 4.7.1 Matriz básica de marcadores AFLPs	144
6 - Bibliografía	171

Índice de Cuadros y Figuras:

	página
Figura 1.2.1 - Representación esquemática correspondiente a la mitad de un glomérulo de los amarantos graníferos cultivados según Pal (1972a).	13
Cuadro 1.3.1 - Análisis comparativo entre los contenidos nutricionales de amaranto y otros granos (Nu-World Amaranth Inc., 1998).	17
Cuadro 3.1.1 - Detalle de los cultivares y las líneas experimentales de <i>Amaranthus</i> analizados en este estudio.	30
Figura 3.2.1 - Tamaño de las plantas alcanzado al momento de extracción de ADN.	32
Figura 3.6.1 - Esquema que resume el procedimiento de AFLP con un par de iniciadores, según Lin <i>et al.</i> (1995).	43
Figura 3.6.2 - Negativo del gel con los productos amplificados en la PCR +1.	47

Figura 3.7.1 -	Posibles combinaciones que pueden presentarse al comparar dos genotipos para un carácter del tipo doble estado.	56
Figura 4.1.1 -	Negativo del gel con los ADNs extraídos de amaranto según los tres protocolos ensayados.	61
Figura 4.1.2 -	Negativo del gel con los ADNs extraídos de amaranto a partir de tejido fresco y liofilizado.	62
Figura 4.2.1 -	Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos como resultado del experimento factorial entre distintas concentraciones de Cl_2Mg , dNTPs e iniciadores.	64
Figura 4.2.2 -	Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con los iniciadores OPB01 y OPC02 a partir de muestras de ADNs extraídas con el protocolo de Hoisington <i>et al.</i> (1994) y el protocolo resumen.	66
Figura 4.2.3 -	Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos con el iniciador OPB01 y ADNs extraídos a partir de tejido liofilizado.	67
Figura 4.3.1 -	Negativo correspondiente a los polimorfismos observados en la línea G10/13 con los iniciadores OPA15 y OPC02.	71
Cuadro 4.4.1 -	Código, secuencia y número de bandas obtenidas con los 67 iniciadores.	73
Figura 4.4.1 -	Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con el iniciador OPC12 en las 20 entradas de amaranto.	74
Figura 4.4.2 -	Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con el iniciador OPD13 en las 20 entradas de amaranto.	75
Figura 4.4.3 -	Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos con distintos iniciadores en una entrada representante de cada especie.	76
Figura 4.4.4 -	Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Jaccard a las 20, entradas utilizando caracteres RAPDs.	78
Figura 4.4.5 -	Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de Nei y Li a las 20 entradas, utilizando caracteres RAPDs.	79
Figura 4.4.6 -	Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y el coeficiente de Jaccard.	81
Figura 4.4.7 -	Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y el coeficiente de Nei & Li.	82
Figura 4.5.1 -	Ordenamiento de las entradas en función de los marcadores especie-específicos.	85
Cuadro 4.5.1 -	RAPDs entrada-específicos que identifican a algunas de las 20 entradas de amaranto.	86

Cuadro 4.5.2 -	<i>Fingerprintings</i> establecidos con 16 marcadores RAPDs para las 20 entradas analizadas.	87
Cuadro 4.5.3 -	Índices de contenido polimórfico promedio para los iniciadores RAPDs.	88
Cuadro 4.5.4 -	Índices de contenido polimórfico promedio para grupos de iniciadores RAPDs de acuerdo al número de bandas totales.	89
Figura 4.6.1 -	Patrones de AFLP de dos reacciones de PCR+1 independientes.	90
Cuadro 4.7.1 -	Código, secuencia y número de bandas obtenidas con los pares de iniciadores <i>EcoR</i> I y <i>Mse</i> I.	92
Figura 4.7.1 -	Patrones de AFLPs obtenidos con distintos iniciadores en una entrada de cada especie.	94
Figura 4.7.2 -	Patrones de AFLPs logrados con la combinación de los iniciadores <i>EcoR</i> I 41 y <i>Mse</i> I 43 en las 20 entradas de amaranto.	95
Figura 4.7.3 -	Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Jaccard a las 20 entradas, utilizando caracteres AFLPs.	96
Figura 4.7.4 -	Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de Nei y Li a las 20 entradas, utilizando caracteres AFLPs.	97
Figura 4.7.5 -	Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores AFLPs y el coeficiente de Jaccard.	98
Figura 4.7.6 -	Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores AFLPs y el coeficiente de Nei & Li.	98
Figura 4.8.1 -	Ordenamiento de las entradas en función de los marcadores especie-específicos.	100
Cuadro 4.8.1 -	AFLPs entrada-específicos que identifican a algunas de las 20 entradas de amaranto.	101
Cuadro 4.8.2 -	<i>Fingerprintings</i> establecidos con 16 marcadores AFLPs para las 20 entradas analizadas.	103
Cuadro 4.8.3 -	Índices de contenido polimórfico promedio para las combinaciones de iniciadores AFLPs.	104
Cuadro 4.8.4 -	Índices de contenido polimórfico promedio para grupos de combinaciones de iniciadores AFLPs de acuerdo al número de bandas totales.	104
Cuadro 4.9.1 -	Síntesis comparativa entre la información obtenida por los caracteres RAPDs y AFLPs.	105
Cuadro 4.9.2 -	Promedio de similitud genética de las matrices de similitud para cada especie y tipo de marcador molecular.	107

Figura 4.9.1 - Evaluación de la congruencia taxonómica variando la naturaleza de los caracteres y las técnicas de clasificación.	108
Cuadro 4.10.1 - <i>Fingerprintings</i> establecidos con 24 marcadores isoenzimáticos para las 20 entradas analizadas.	121
Figura 4.11.1 - Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y AFLPs y el coeficiente de Jaccard.	124
Figura 4.11.2 - Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y AFLPs y el coeficiente de Nei & Li.	124

1 - INTRODUCCIÓN

1.1 - Origen, Historia y Distribución:

El amaranto se ubica sistemáticamente dentro del orden Centrospermales, familia Amaranthaceae, género *Amaranthus*, habiéndose identificado dentro de este género más de 60 especies.

El origen de varias especies cultivadas de *Amaranthus* ha sido difícil de establecer, debido a que sus ancestros silvestres son malezas de amplia distribución geográfica. Entre ellos *Amaranthus spinosus* L., *A. hybridus* L. y *A. dubius* Mart. corresponden a morfotipos típicamente tropicales, mientras que *A. retroflexus* L., *A. viridis* L., *A. lividus* L. y *A. graecizans* L. son malezas distribuidas en regiones más templadas (Grubben y van Sloten, 1981).

Las especies hortícolas cultivadas más importantes de amaranto son: *A. tricolor* L., originaria del sur o sudeste de Asia, *A. lividus* nativa del sur o centro de Europa y *A. dubius* originaria de América Central. Por otra parte, varios autores coinciden en afirmar que todos los amarantos graníferos son originarios de América (Hauptli y Jain, 1984; Hunziker, 1943, 1952; Sauer, 1950, 1967; Sreelathakumary y Peter, 1993). *A. cruentus* L., *A. hypochondriacus* L. y *A. caudatus* L. son entre las especies graníferas domesticadas las más cultivadas. Con respecto al origen de estas tres especies existen dos hipótesis propuestas por Sauer (1967, 1976), una de ellas propone un origen polifilético a partir de tres especies silvestres *A. hybridus*, *A. powellii* L. y *A. quitensis* S., distribuidas en tiempos precolombinos en el norte de América Central, oeste de América del Norte y en las áreas montañosas de Ecuador, respectivamente. *A. cruentus* fue domesticada posiblemente a partir de *A. hybridus* en América Central, *A. hypochondriacus* de *A. powellii* en Méjico y *A. caudatus* de *A. quitensis* en

América del Sur. La otra hipótesis por el contrario, propone un origen monofilético de estos cultivos, considerando un progenitor semejante a la especie *A. cruentus* en Guatemala, domesticado a partir de *A. hybridus*, el que subsecuentemente habría migrado al norte y oeste de Méjico, en donde habría sufrido introgresiones con *A. powellii* originando a *A. hypochondriacus*, como también habría migrado hacia el sur, a la región andina, en donde del mismo modo, con *A. quitensis* darían origen a *A. caudatus*. Numerosos estudios comparativos de morfología, isoenzimas, análisis de híbridos y con ADN (Ácido desoxirribonucleico) de cloroplastos y nuclear, se realizaron entre amarantos cultivados y silvestres; sin embargo no se encontró ninguna evidencia concluyente acerca de las posibles relaciones filogenéticas de estos materiales (Hauptli y Jain, 1984; Lanoue *et al.*, 1996; Pal y Khoshoo, 1972, 1973a, 1974). Chan y Sun (1997) utilizaron isoenzimas y RAPDs para establecer las relaciones filogenéticas de los amarantos graníferos y sus resultados concordaron con el origen monofilético a partir del ancestro común *A. hybridus*.

El cultivo de amaranto en América data de más de 4000 años. Las principales especies graníferas que encontraron los españoles a su llegada al Continente Americano fueron maíz, poroto, quinua y amaranto. Este último era el principal cultivo de América Central y ocupaba una extensión considerable en los Andes Sudamericanos. El amaranto además de ser empleado como alimento, tributo o pago de impuestos, formaba parte de ciertos ritos religiosos de las tribus Aztecas. Debido a ello, en el período colonial, la Iglesia Católica prohibió su consumo, relegándolo al estado de cultivo intrascendente (Nieto Cabrera, 1989).

Recientemente, el amaranto ha sido redescubierto por su elevado valor nutritivo en Estados Unidos, Méjico, Centro y Sudamérica. También su cultivo se ha incrementado en Asia, especialmente en Nepal y en las áreas montañosas del sur y norte de la India (Grubben y van Sloten, 1981). El cultivo de los amarantos graníferos es practicado en el noroeste de Argentina desde mucho antes de la conquista española, así lo testifican hallazgos arqueológicos. Uno

de los cuales, realizado en el área meridional del país (provincia de Mendoza), determinó una antigüedad de 2000 años a un depósito de semillas de *A. caudatus*. Otro amaranto granífero muy afín al anterior es *A. mantegazzianus* Passer., endémico del noroeste argentino, pero que actualmente sólo se halla en áreas cultivadas. Por otra parte, es posible que las especies *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* nunca se cultivaran en el Imperio Incaico. Fuera del área cultivada por los aborígenes americanos, los amarantos graníferos sudamericanos sólo se han sembrado, desde principios de este siglo, en pequeñas parcelas experimentales de las provincias de Salta y Jujuy (Covas, 1994b). Actualmente se realizan trabajos experimentales y analíticos sobre amarantos en la Estación Experimental Anguil de INTA, la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Pampa, la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires y en la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la Universidad Nacional de Río Cuarto, contando entre las distintas instituciones con más de 500 entradas. Finalmente en nuestro país el Ministerio de Salud y Acción Social ha aprobado la inclusión de los amarantos graníferos en el Código Alimentario Argentino, por resolución número 80 del 13 de enero de 1994, hecho sobresaliente que tiende a cimentar al amaranto como un cultivo alternativo.

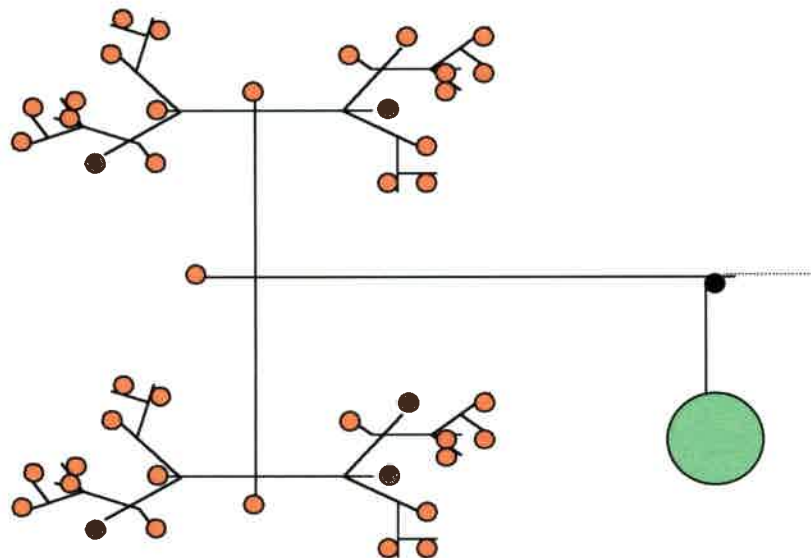
1.2 - Morfología, Biología reproductiva y Citología:

La mayoría de las especies del género *Amaranthus* son plantas anuales, herbáceas y se caracterizan por presentar tallos suculentos en el estadio vegetativo y algo lignificados en el estadio reproductivo, pudiendo llegar a medir hasta 3 m de altura. Las raíces son del tipo axomorfo bien desarrolladas, con numerosas raíces secundarias y terciarias. La planta presenta un eje central bien diferenciado y muchas especies tienden a ramificar a media altura o desde la base del tallo. Las hojas son generalmente opuestas o alternas, sin estípulas, de formas elíptica o obovada y lisas o pubescentes con nervaduras pronunciadas. El color de la planta puede variar desde verde hasta púrpura con dife-

rentes colores intermedios como rojo, rosado o café. Las inflorescencias son muy vistosas y se presentan desde totalmente erectas hasta decumbentes y en cuanto a colores varían desde amarillas, anaranjadas, cafés, amarillentas, rojas, rosadas hasta púrpuras (Nieto Cabrera, 1989).

Las especies cultivadas de amarantos graníferos son monoicas con flores pequeñas, unisexuales, reunidas en glomérulos formando falsas umbelas con tres o cinco brácteas externas cada una. Las flores masculinas poseen tres o cinco estambres y las femeninas presentan ovario súpero dando una sola semilla. El glomérulo es una ramificación dicásial cuya primera flor es terminal y siempre masculina; en su base nacen dos flores laterales femeninas, las que a su vez son terminales, de cuyas bases se originan otras dos flores femeninas y así continúa sucesivamente hasta que la planta madura (figura 1.2.1). Un glomérulo puede alcanzar a poseer hasta 250 flores femeninas, aunque el número de flores polinizadas es mucho menor (Nieto Cabrera, 1989; Pal, 1972a).

Figura 1.2.1: Representación esquemática correspondiente a la mitad de un glomérulo de los amarantos graníferos cultivados según Pal (1972a).



Las flores femeninas están representadas por círculos rojos, la flor masculina por un círculo negro y el círculo verde corresponde al eje de la panoja. Las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* presentan este tipo de arreglo en la estructura floral con muy pequeñas diferencias entre ellas.

El fruto botánicamente es un pixidio unilocular, presentando dehiscencia transversal. La semilla alojada en su interior es muy pequeña de 1 a 1,5 mm de diámetro y el número de semillas varía entre 1000 a 3000 por gramo. La semilla es de forma esférica y también como el resto de la planta presenta colores muy variados: blanco, blanco amarillento, dorado, rosado, rojo y negro (Nieto Cabrera, 1989; Pal, 1972a).

Las especies graníferas se caracterizan por presentar porte erecto, tallo principal bien desarrollado y grandes inflorescencias terminales; las semillas pueden ser de color claro, blanco o también de color negro. En cambio, todas las especies silvestres presentan granos de color negro con cubiertas muy duras. Al comparar los amarantos graníferos con los amarantos de hoja, la relación hoja : tallo es generalmente menor, el contenido de materia seca es mayor y la producción de semillas es al menos cinco veces superior. El rendimiento por planta es de 40000 a 60000 semillas (Grubben y van Sloten, 1981; Hunziker, 1943, 1952; Sauer, 1950, 1967).

La mayoría de las especies son predominantemente autógamas, aunque los estigmas de las flores pistiladas pueden permanecer receptivos (protoginia) algunos días antes de la apertura de las flores masculinas, las que representan entre el 0,5 al 1% del glomérulo. En los amarantos graníferos más cultivados, *A. hypochondriacus*, *A. cruentus* y *A. caudatus*, se ha calculado el porcentaje de alogamia a nivel intra e inter-específico, obteniéndose como resultado valores que sugieren comportamientos autogámicos. Los porcentajes de alogamia obtenidos entre individuos de una misma población varían entre 10 y 50% dependiendo de varios factores, tales como cultivar, viento, viabilidad y cantidad de polen e insectos (Agong y Ayiecho, 1991; Hauptli y Jain, 1985; Jain *et al.*, 1982; Nieto Cabrera, 1989).

Varios autores han demostrado la existencia de barreras reproductivas entre las especies de *Amaranthus* (Behera y Patnaik 1974, 1982; Desai, 1971;

Grant, 1959a, b, c; Greizerstein y Poggio, 1992; Khoshoo y Pal, 1972; Pal, 1972a; Pal *et al.*, 1982; Pal y Khoshoo, 1973a, b).

En el género se ha encontrado dos números gaméticos, $n=16$ y $n=17$, registrándose en algunas especies como *A. cruentus* y *A. hypochondriacus* la presencia de ambos números gaméticos en sus cultivares (Greizerstein y Poggio, 1994; Palomino y Rubí, 1991). El número de cromosomas presentes en 30 especies evaluadas, muestra que todas son diploides con excepción de *A. dubius* que resultó ser tetraploide (Sreelathakumary y Peter, 1993). Greizerstein y Poggio (1992) aportaron nuevas evidencias acerca del origen tetraploide del género ($x=8$) y del número básico derivado actual $x=17$ a partir de $x=16$ por trisomía primaria.

Greizerstein y Poggio (1994) realizaron estudios cariológicos y del contenido en ADN en amarantos. *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* presentaron $2n=32$ coincidiendo con los resultados de estudios previos realizados por Grant (1959c) y Tandom y Tawakley (1970). *A. hypochondriacus* también presentó $2n=32$ cromosomas al igual que los resultados presentados por Pal (1972b) y Pal *et al.* (1982), aunque algunos autores también han encontrado $2n=34$ en esta especie (Palomino y Rubí, 1991; Tandom y Tawakley, 1970). Finalmente en *A. cruentus* obtuvieron $2n=34$, encontrándose en la bibliografía de esta especie $2n=32$ y 34 (Grant, 1959c; Pal y Khoshoo, 1973a; Palomino y Rubí, 1991; Tandom y Tawakley, 1970). El contenido de ADN total ($2C$) estimado en *A. hypochondriacus* y en *A. cruentus* fue de 1,26 picogramos (pg), en *A. caudatus* fue 1,35 pg y 1,46 pg en *A. mantegazzianus*.

1.3 - Fisiología e Importancia del cultivo:

El amaranto es una de las pocas especies que no perteneciendo a la familia de las gramíneas realiza fotosíntesis vía C4. Esto le permite tener una alta eficiencia fotosintética, ya que las pérdidas de carbono por fotorespiración

son nulas. En este cultivo, la respuesta a la influencia del fotoperíodo para la floración y fructificación ocurre en días cortos (Fasheum, 1986; Trujillo, 1986).

El rango de adaptación del amaranto varía desde el nivel del mar hasta los 2800 m de altura. En general todas las especies crecen mejor cuando la temperatura promedio no es inferior a 15°C y el promedio de temperaturas óptimas del cultivo es entre 18 y 24°C (Nieto Cabrera, 1989).

Es un cultivo que requiere la presencia de humedad adecuada en el suelo durante la germinación y el crecimiento inicial; luego que las plantas se han establecido pueden prosperar muy bien en ambientes de humedad limitada, adaptándose mejor a ambientes secos y calientes que a aquellos con exceso de humedad. Las especies graníferas pueden dar cosechas con rendimientos aceptables en ambientes con 300 a 400 mm de precipitación anual (Kauffman, 1979; Rangel, 1986).

Algunos amarantos han sido cultivados con fines ornamentales, mientras que otros son relevantes como cultivos graníferos, hortícolas o forrajeros, debido a que poseen un elevado contenido de proteínas en las hojas y semillas, con una alta proporción del aminoácido esencial lisina (Covas, 1984). Las especies graníferas son las de mayor importancia económica.

La alta calidad nutritiva que se le atribuye a estas especies se debe fundamentalmente a los niveles de proteína. En el grano alcanza un rango de 14 a 19% de proteína y en la hoja varía entre 20 y 30%, respectivamente. El balance de aminoácidos es muy adecuado, destacándose el aminoácido lisina con contenidos de 4 a 7% en el total de proteínas (Carlsson, 1977; Casillas Gómez, 1986; Cervantes, 1986). El balance de aminoácidos y el valor nutritivo en general es muy similar a los niveles recomendados por la FAO, para la alimentación humana, si se utiliza una mezcla de iguales proporciones de amaranto y trigo, o amaranto y arroz, o amaranto y maíz (Singhal y Kulkarni, 1988).

Cuadro 1.3.1: Análisis comparativo entre los contenidos nutritivos de amaranto y otros granos (Nu-World Amaranth Inc., 1998).

	Amaranto	Trigo	Maíz	Arroz	Cebada
Proteína (g)	19	12,8	9,4	5,6	15,8
Fibra cruda (g)	5,6	2,3	3	0,3	3
Grasa (g)	6	1,7	4,7	0,6	6,9
Carbohidratos (g)	68	71	74	79,4	66
Calcio (mg)	250	29,4	7	9	54
Hierro (mg)	15	4	2,7	4,4	5
Calorías	414	334	365	360	389

Totales sobre 100 gramos.

Desde 1977 el Rodal Research Center junto con varias instituciones en Estados Unidos y Canadá, está realizando tareas de mejoramiento en el germoplasma de amarantos graníferos, por medio de selección individual y masal. Las selecciones realizadas son para obtener genotipos que reúnan las cualidades que requiere la agricultura moderna. En el programa de mejoramiento se seleccionan caracteres que son relativamente fáciles de mejorar tales como reducción de la altura de la planta (1 a 1,5 m), inflorescencia sobre la canopia, ausencia de ramificaciones, semillas de color claro, 100 a 120 días de maduración, mayores rendimientos como resultado de aumentar el tamaño de la inflorescencia y otros caracteres con mayores dificultades de seleccionar tales como el tamaño de la semilla, tolerancia a insectos y a enfermedades, vigor de las plántulas, alto contenido proteínico, etcétera. A fines de 1980 salieron al mercado los primeros cultivares de amaranto obtenidos en la Universidad de Cuzco en Perú, en La Estación Experimental de Agricultura de Montana y en la India, promoviendo la comercialización de este cultivo (Kauffman y Weber, 1990).

El futuro promisorio de los amarantos en la Argentina se fundamenta en la gran extensión del área apta para el cultivo de los mismos, que abarca no menos de 5 millones de hectáreas, sin desplazar a otras actividades agrope-

cuarias, situadas principalmente en la región semiárida del país, al norte de la región Patagónica. Esta área se caracteriza por abarcar cerca de 20° de latitud y alturas sobre el nivel del mar que se extienden desde la costa atlántica hasta unos 3000 m de altitud, con lluvias anuales de 400 a 800 mm aproximadamente.

1.4 - Clasificación, Taxonomía y Diversidad genética:

Una clasificación es el agrupamiento de objetos en clases sobre la base de atributos que poseen en común y/o sus relaciones (Crisci y Lopez Armengol, 1983) y por otra parte la taxonomía es el estudio teórico de esas clasificaciones. Para establecerlas, los sistemáticos utilizan generalmente caracteres fenotípicos, los que son producidos por el genotipo, ambiente e interacción genotipo-ambiente (Davis, 1983). Algunas entradas de amarantos graníferos pudieron ser clasificadas dentro de una especie en particular, empleando sólo caracteres morfológicos (Covas, 1994a; Feine, 1986; Hunziker, 1943, 1952; Sauer, 1950, 1967). Sin embargo, la variación de dichos caracteres debido a factores genéticos, ambientales y a la interacción genotipo-ambiente, a menudo provocaron una clasificación equivocada de los materiales analizados (Transue *et al.*, 1994). En varias especies vegetales se ha demostrado que si el comportamiento de un carácter es muy plástico y de baja heredabilidad, puede enmascarar las verdaderas relaciones genéticas, siendo de poca utilidad para estudios con propósitos taxonómicos (Davis, 1983; Pigliucci *et al.*, 1991). Por lo tanto, es muy difícil determinar si el genoma es completamente descrito por los caracteres morfológicos, o si fenotipos similares reflejan realmente genotipos similares (Smith y Smith, 1992).

Las proteínas y el ADN también son empleados rutinariamente para establecer relaciones entre organismos. La variación de estos marcadores moleculares es ubicua, por lo que puede ser comprendida en términos genéticos,

ventaja que permite aceptarlos ampliamente como fuente de datos en estudios evolutivos, taxonómicos y genéticos (Tanksley y Orton, 1983; Weir, 1990).

Diversos sistemas enzimáticos fueron empleados en el cálculo de la diversidad genética intra e inter-poblacional de varias especies del género *Amaranthus* (Hauptli y Jain, 1984). Los resultados muestran un alto número de alelos fijados o casi fijados en distintas poblaciones de las especies predominantemente autógamas *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*. Debido al bajo valor de diversidad obtenido en el grupo de especies evaluadas fueron hallados pocos alelos especie-específicos, dificultando los estudios taxonómicos intra-específicos (Chan y Sun, 1997). Estos resultados son similares a los de muchas especies vegetales, por lo que la utilidad de estos marcadores en la determinación de la diversidad genética ha sido en muchos casos limitada por la baja frecuencia de diversidad alélica (Goodman *et al.*, 1980).

Estudios de diversidad genética en distintas especies graníferas y hortícolas del género, basados en caracteres morfológicos y marcadores isoenzimáticos, demuestran un marcado contraste entre los polimorfismos morfológicos y los patrones monomórficos hallados para casi todos los loci isoenzimáticos ensayados (Hauptli y Jain, 1984; Jain *et al.*, 1980).

Los marcadores moleculares de ADN permiten, al igual que los caracteres morfológicos e isoenzimáticos, obtener una medida cuantitativa de la variabilidad genética de una colección de germoplasma. Con esta información es posible:

- 1) Identificar material duplicado en la colección.
- 2) Establecer una colección de referencia.
- 3) Determinar los grados de similitud entre especies cultivadas y salvajes.
- 4) Establecer prioridades para la adición de material nuevo a una colección.

Existen antecedentes sobre la utilización de distintos tipos de marcadores moleculares, principalmente en el estudio de la variabilidad entre especies o

bien entre individuos de una misma especie, pero poca información sobre el estudio de variedades protegidas que demuestran una alta relación genética involucrando dificultades para su caracterización y diferenciación.

El Plan Plurianual de Ciencia y Tecnología de 1999-2001 de nuestro país presenta como prioridades sectoriales y en temas específicos a la Biotecnología y a la Biodiversidad. Considerando necesario fortalecer tanto la investigación como la formación de recursos humanos en las áreas de conocimiento que permitan conocer la composición y dinámica de los ecosistemas naturales y poner en práctica formas de aprovechamiento sustentable de la biodiversidad. Se establecieron, entre otras, las siguientes líneas prioritarias: Promover el fortalecimiento de las instituciones dedicadas a la investigación de Biodiversidad y a la capacitación de taxónomos y curadores. Organizar Bases de Datos con la información preexistente, haciendo posible y accesible la información disponible, estableciendo el estado del conocimiento sobre Biodiversidad, para evaluar y detectar los requerimientos determinando líneas prioritarias de investigación. Fomentar líneas de trabajo tendientes a actualizar y completar un Inventario de Biodiversidad y establecer sistemas de monitoreo para el seguimiento, la detección temprana de problemas y la predicción de la evolución de los componentes de la Biodiversidad. En el mismo sentido, la Resolución C.S. 086/97 de la Universidad Nacional de Río Cuarto estableció líneas generales para la política de Ciencia, Tecnología y Extensión Universitaria. Sobre la base de las demandas sociales, económicas y educativas identificadas en la región del Centro-Sur de Córdoba define áreas y temas de interés hacia donde la Universidad dirigirá sus mayores aportes para la creación de conocimientos. Entre las áreas se enumeran a los sistemas agroalimentarios y a la biotecnología. Entre los temas de interés en los sistemas agroalimentarios se definió la obtención de nuevos genotipos vegetales de interés para la producción de alimentos y en biotecnología se determinaron como temas de interés a los estudios moleculares y genéticos básicos sobre especies vegetales y al mejoramiento genético de especies vegetales.

1.5 - Marcadores moleculares RAPDs (Random-Amplified-Polymorphic DNA):

Los marcadores moleculares basados en la secuencia del ADN, permiten una comparación clara y directa del material genético de dos o más organismos, evitando alguna influencia ambiental sobre la expresión génica. La técnica de la Reacción en Cadena de la *Taq* (*Thermus aquaticus*) ADN Polimerasa (PCR) es una herramienta de extrema utilidad en biología molecular. La misma consiste en la multiplicación *in vitro*, de una o unas pocas cadenas de ADN de una longitud discreta hasta niveles tales que permitan su fácil detección en geles.

Williams *et al.* (1990) describieron una variante de PCR para detectar polimorfismos que se denomina polimorfismos del ADN amplificados al azar (RAPDs).. Ésta consiste en emplear iniciadores cortos con una secuencia arbitraria de 10 nucleótidos, que se unen por complementariedad de bases al genoma. Los productos obtenidos, tras sucesivos ciclos de amplificación, son segmentos discretos de ADN de 300 a 3000 pares de bases. Los polimorfismos, hallados entre los productos de amplificación de diferentes individuos, presentan como ventaja que no se requiere de información previa sobre la secuencia nucleotídica de ADN a ser analizada. Penner *et al.* (1993) probaron la repetibilidad de los patrones RAPDs, utilizando esta técnica de análisis en distintos laboratorios. Los resultados obtenidos mostraron variación entre laboratorios. Esta variación se presentó en el rango de tamaño en los fragmentos de RAPDs amplificados, como también en la repetibilidad de acuerdo a los iniciadores elegidos. Siendo para los autores la causa principal de la variación en el rango de tamaño de los fragmentos amplificados, el tipo de termociclador empleado, y consideran que la distribución de bases en el extremo 3' de la secuencia del iniciador, puede ser la determinante de la unión con distinto porcentaje de homología al ADN.

Los iniciadores permiten detectar segmentos polimórficos entre individuos, producidos por: 1) inversión de los sitios de unión del iniciador con ausencia en el gel del fragmento, 2) la sustitución de una base en el ADN la cual afecta la unión de uno de los iniciadores al ADN molde por cambios en la homología, conduciendo a la presencia/ausencia o cambio en el tamaño del fragmento obtenido, 3) delección del sitio de unión del iniciador al fragmento de ADN provocando la ausencia del fragmento, 4) inserciones de trozos de ADN que incrementan la separación de los sitios de unión del iniciador sobre el límite de amplificación también provoca la ausencia del fragmento y 5) pequeñas inserciones o deleciones que resultan en cambios en el tamaño de los productos amplificados.

Estas características hacen que los RAPDs sean mayormente marcadores dominantes (Tingey y del Tufo, 1993; Williams *et al.*, 1990). Sólo en el caso en que los polimorfismos se deban a pequeñas inserciones o deleciones se observa una herencia codominante del marcador obtenido, permitiendo que el genotipo heterocigota sea distinguible de ambos homocigotas. Sin embargo, en la práctica la ocurrencia de cambios en el tamaño de los fragmentos es rara. En cambio, lo que ocurre usualmente con un RAPD es la presencia (alelo A) o ausencia (alelo a) del marcador. Un fragmento es igualmente visto en el estado homocigota AA o heterocigota Aa y sólo la ausencia del mismo revela al genotipo homocigota aa.

Los polimorfismos capaces de ser detectados por RAPDs (Williams *et al.*, 1990) permiten que estos marcadores sean utilizados para estudios de diversidad genética, relaciones genéticas, mapeo de genes, mejoramiento vegetal, marcadores de ADN y genética de poblaciones (Vierling y Nguyen, 1992).

Los marcadores moleculares RAPDs se han utilizado para la caracterización de diversos recursos genéticos vegetales (Andersen y Faribanks, 1990; Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Joshi y Nguyen, 1993; Wening y Langridge, 1991).

1.6 - Marcadores moleculares AFLPs (Amplified-Fragment-Length-Polymorphisms):

Vos *et al.* (1995), basados en la técnica de PCR, desarrollaron un nuevo tipo de marcadores moleculares para el análisis de ADN genómico, sin la necesidad de conocer su secuencia. En esta metodología, primero el ADN es digerido por dos endonucleasas de restricción, una de alta y otra de baja frecuencia de corte. Posteriormente, se realiza una reacción de ligación entre los fragmentos de restricción y adaptadores de doble cadena que contienen la secuencia de nucleótidos complementaria al sitio de restricción reconocido por las dos enzimas. Con el producto de la reacción de ligación se realizan dos reacciones de PCR. En la primera reacción se utilizan como iniciadores la secuencia del adaptador más un nucleótido en 3' elegido al azar, y en la segunda reacción, tres nucleótidos selectivos que determinan secuencias arbitrarias de amplificación. Los polimorfismos de los fragmentos amplificados de ADN (AFLPs) son finalmente observados en un gel del tipo de secuenciación.

La técnica de AFLP al igual que la técnica de RFLP (Restriction-Fragment-Length-Polymorphism) se basa en detectar fragmentos genómicos de restricción. La diferencia entre ellas radica en que para AFLP se emplea una amplificación por PCR para observar en la mayoría de los casos la presencia o ausencia de los fragmentos de restricción amplificados (marcador dominante). Al igual que en RAPDs sólo en el caso en que los polimorfismos se deban a pequeñas inserciones o deleciones, se observa una herencia codominante del marcador obtenido. Mientras que la técnica de RFLP se asocia con *Southern blot* (Southern, 1975) para evaluar diferencias en el tamaño de los fragmentos, siendo un marcador codominante (Vos *et al.*, 1995).

El nivel de polimorfismo obtenido por AFLP depende de la relación entre el número de nucleótidos seleccionados en los iniciadores para la amplificación por PCR y la complejidad del genoma analizado. La repetibilidad de los patrones de AFLP está garantizada por el uso de adaptadores de ligación sitio-

específico, e iniciadores de secuencia determinada por los sitios de restricción, más un número variable de nucleótidos selectivos manteniendo condiciones estrictas de amplificación (Lin y Kuo, 1995).

Numerosas poblaciones vegetales, de diferente complejidad genómica, han sido descritas en: sus relaciones genéticas, mapeo génico, estudios de segregación, análisis de germoplasma, utilizando para ello los marcadores moleculares AFLPs (Hill *et al.*, 1996; Lin y Kuo, 1995; Maheswaran *et al.*, 1997; Powell *et al.*, 1996).

1.7 - Sistema de Protección y Control de semillas en la Argentina:

El contenido genético de cada semilla representa un gran esfuerzo de investigadores y de programas de mejoramiento. Por otra parte el gran crecimiento de la producción de semillas y las demandas del mercado, llevaron a la creación de la ley de las semillas. En nuestro país dicha legislación está ordenada bajo el número N° 20.247 (Ley de Semillas y Creaciones Fitotécnicas) y el organismo responsable de su aplicación es el Instituto Nacional de Semillas (INASE), cuyo principal objetivo es proveer un cuadro legal y técnico.

Dentro de esta Institución se crea la Lista Nacional de Cultivares, donde se encuentran todas las variedades que se comercializan en el país y la Lista Nacional de propiedad de Cultivares, en la cual se encuentran todas las variedades protegidas. La función de otorgar un título de propiedad a una nueva variedad está destinada al Registro Nacional de Cultivares del INASE.

La ley N° 24.736/94, establecida por el Congreso de la Nación Argentina, acepta la adherencia de nuestro país a la Convención Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales (UPOV). Esto permite aumentar la con-

fianza nacional e internacional en el ámbito de la concesión de propiedad al criador de una nueva variedad.

Para que un criador pueda adquirir el título de propiedad, la nueva variedad debe cumplir con los tres requisitos expuestos en el artículo 6 de la Convención de UPOV (TG/1/2, 1979):

Distinguibilidad (D): Una nueva variedad debe demostrar ser distinta sobre la base de un carácter importante de las ya existentes en el Listado Nacional de Propiedad de cultivares.

Homogeneidad (H): Todas las plantas de una misma variedad deben presentar los mismos caracteres morfológicos, fisiológicos y/o fenológicos, tomando en cuenta su sistema de reproducción.

Estabilidad (E): Todas las plantas de una misma variedad, deben ser estables en sus características esenciales, luego de repetidas multiplicaciones o reproducciones.

Todos los países adheridos a UPOV, con el fin de lograr coherencia en los resultados, realizan a campo las pruebas (DHE) para diferenciar e identificar una variedad de otras, dentro de la colección de cada especie. Para este estudio en la actualidad se utilizan las características morfológicas y los datos complementarios a partir de la utilización de técnicas bioquímicas tradicionales (electroforesis en geles de poliacrilamida de proteínas de reserva e isoenzimas) ya estandarizadas por el Organismo Internacional de Testeo de Semillas (ISTA), en el cual la Argentina posee representantes en el Comité Ejecutivo.

La distinción en la actualidad se establece sobre la base de caracteres que tienen o no una relación con el valor agronómico o tecnológico de la variedad. Basta con una diferencia relativa a un carácter (calificado como "importante") para llegar a la conclusión de que una variedad es distinta de otras (UPOV/QUI/96/15, 1996).

1.8 - Caracterización e Identificación de nuevas líneas y cultivos:

La caracterización de un organismo es el registro de caracteres altamente heredables, que varían muy poco cuando las plantas son probadas en diferentes ambientes. La estandarización de métodos de observación y registro, en bancos de datos, de estos caracteres es esencial para una descripción eficaz de las colecciones. Las caracterizaciones son útiles para la clasificación de germoplasma y para el estudio de patrones de variabilidad durante la regeneración de los *stocks* (IBPGR, 1987).

Un organismo puede ser caracterizado por un amplio rango de caracteres. En cambio la identificación del mismo requiere de un inequívoco *fingerprint* (Nicese *et al.*, 1998).

Los caracteres fenotípicos, tales como los morfológicos, son extremadamente útiles para la caracterización de organismos. Pero muchas veces están influenciados por las condiciones ambientales y además el control genético de la mayoría de estos caracteres es complejo. Por lo que, en muchos casos de selección de híbridos o en la determinación de pedigrí, no es suficiente el empleo de estos marcadores. Las proteínas presentan la ventaja de que en su mayoría son el producto de genes únicos. Aunque el rango de proteínas, que pueden ser empleadas como marcadores moleculares está limitado a aquellas que son visualizadas como extracto de un órgano en particular o por el número de isoenzimas que produce un producto de reacción colorimétrico. Los marcadores moleculares de ADN, presentan las ventajas de no ser afectados por el ambiente y el número de éstos es definido por la técnica y la complejidad del genoma en estudio.

No existe una técnica de análisis molecular única que pueda ser recomendada como óptima en todas las situaciones de caracterización de organismos vegetales. Las descripciones de los materiales basadas en caracteres,

que reflejen variación genética, son empleadas rutinariamente para medir diversidad, pudiendo de este modo, ser usadas para caracterizar y lograr una eficiente conservación, identificación y utilización de los recursos vegetales cultivados y de sus respectivas poblaciones naturales.

Los RAPDs han sido usados para identificar variedades de especies vegetales cultivadas de genomas con distinta complejidad. Así es como, hasta el presente, la combinación de diferentes números de iniciadores ha permitido discriminar patrones moleculares a nivel de ADN en cultivares de cacao (*Theobroma cacao*) (Wilde *et al.*, 1992), variedades de arroz (*Oriza sativa*) (Welsh y McClelland, 1990), soja (*Glycine max*) (Caetano-Anolles *et al.*, 1991), genotipos del género *Brassica* (Demeke *et al.*, 1992), trigo (*Triticum monococum*, *T. urartu*) (Vierling y Nguyen, 1992), apio (*Apium graveolens*) (Yang y Quiros, 1993).

Transue *et al.* (1994) utilizaron la técnica de RAPDs para determinar su utilidad potencial en la identificación de materiales de amaranto. Para ello encontraron iniciadores específicos para las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* útiles para identificar entradas de amarantos graníferos descritas previamente por caracteres morfológicos. Ranade *et al.* (1997), lograron con perfiles de RAPDs generados por 2 o 3 iniciadores, patrones únicos no sólo inter sino también intra-específicamente en varias especies del género *Amaranthus*.

La técnica de AFLP ha sido también empleada para comparar diferentes sistemas de marcadores moleculares en la caracterización de genotipos vegetales (Lin *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996). Esta técnica, junto con la de RAPD, se ha caracterizado por la habilidad que posee para identificar genotipos vegetales, por el alto contenido de información resultante. Así, los marcadores RAPDs y AFLPs son ampliamente usados como *fingerprintings* de ADNs, cuando existe la necesidad de identificar variedades de especies cultivadas o,

para determinar el parentesco de los distintos materiales en programas de mejoramiento (Dulson *et al.*, 1998; Guillin *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1996).

El grupo evaluador de Técnicas Biomoleculares (UPOV/BMT/4/21, 1997) planteó que éstas son importantes ya que explican la relación existente entre las variedades, brindando información sobre el genoma de las mismas, y enfatizando su importante utilidad en la identificación varietal pero no recomendando las mismas para estudios de diferenciación. Actualmente, se considera a los marcadores moleculares como una herramienta capaz de complementar y subsanar los problemas de la utilización de los datos morfológicos.

2 - OBJETIVOS

Sobre la hipótesis de que los marcadores moleculares de ADN pueden ser lo suficientemente informativos, para estudiar la variabilidad intra e inter poblacional del género *Amaranthus*; se propone en el presente trabajo los siguientes objetivos:

Desarrollar marcadores moleculares de ADN, específicamente de RAPDs y AFLPs, para contribuir a la caracterización de 4 cultivares y 16 líneas experimentales de amarantos graníferos.

Establecer las distancias genéticas entre estas 20 entradas por los marcadores RAPDs y AFLPs obtenidos.

Comparar los agrupamientos logrados por los marcadores de ADN y los establecidos previamente por los caracteres morfológicos.

Determinar patrones de *fingerprinting* en estos materiales tanto para emplearlos en los futuros programas de mejoramiento, como en la inscripción y control de los cultivares creados.

3 - MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 - Germoplasma:

Los materiales utilizados pertenecen a cuatro especies de *Amaranthus* de la colección y programa de mejoramiento de amarantos de la Cátedra de Cereales, Facultad de Agronomía y Veterinaria, de la Universidad Nacional de Río Cuarto. El detalle de las mismas se presenta en el cuadro 3.3.1.

Cuadro 3.1.1: Detalle de los cultivares y las líneas experimentales de *Amaranthus* analizados en este estudio.

Especie	Entrada	Fuente	Origen de la introduc./ Identificación original
<i>A. cruentus</i>	Don Guiem (cv)	UN La Pampa	INTA Anguil, Argentina
	Don Armando (cv)	UN La Pampa	INTA Anguil, Argentina
	G10/13I (L)	AVRDC, Taiwan	Ghana
	G14 (L)	AVRDC, Taiwan	Ghana
	G14/4 (L)	AVRDC, Taiwan	Ghana
	G6 (L)	INTA Anguil	INTA Anguil, Argentina
	G2/1 (L)	RRC, USA	USA / K112
	G6/19 (L)	INTA Anguil	INTA Anguil, Argentina
	G6/2 (L)	INTA Anguil	INTA Anguil, Argentina
<i>A. hypochondriacus</i>	G1 (L)	NBRI, India	India / AG-68
	G1/3 (L)	NBRI, India	India
	Artasa (cv)	UN La Pampa	Criadero Artasa
	G6/1 (L)	RRC, USA	USA / 1023
<i>A. mantegazzianus</i>	G1/3b (L)	INTA Anguil	INTA, Anguil, Argentina
	Don Juan (cv)	UN La Pampa	INTA, Anguil, Argentina
<i>A. caudatus</i>	G16/12I (L)	AVRDC, Taiwan	Uganda
	G16183/14 (L)	CATIE, Costa Rica	Ecuador
	G14/14a (L)	AVRDC, Taiwan	India
	G16186/16 (L)	CATIE, Costa Rica	Ecuador
	G10/3 (L)	Perú	Perú / Oscar Blanco

(cv) cultivar, (L) línea experimental, AVRDC (Asian Vegetable Research Development Center), RRC (Rodale Research Center), NBRI (National Botanical Research Institute), CATIE (Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza).

En el país dos planes de mejoramiento de estas especies se inician a mediados de los años 70, cuando se realizaron recolecciones de germoplasma de amarantos graníferos americanos e introducciones de distintos centros de mejoramiento. En una primera evaluación se identificaron los materiales promisorios. Estas primeras entradas mostraron un variado grado de heterogeneidad entre sus individuos (Covas, 1994a).

Las líneas y cultivares empleados se obtuvieron por selección individual por dos generaciones y posteriormente se multiplicaron en masa eliminando las plantas fuera de tipo. Dado que estas especies de *Amaranthus* son predominantemente autógamias, este procedimiento hace presumir una alta homocigosis. La línea experimental G2/1, proveniente de Estados Unidos, se origina en el cruzamiento de dos cultivares de *A. cruentus*.

En la Universidad Nacional de Río Cuarto con estos materiales se aseguró la autofecundación, cubriendo con bolsas de papel las panojas, durante cinco a seis generaciones.

3.2 - Material vegetal:

Se sembraron entre 30 a 50 semillas de cada una de las entradas seleccionadas, en macetas de plástico de 24 cm de altura y 25 cm de diámetro, manteniendo durante la germinación y el desarrollo de las plantas condiciones semicontroladas de luz y temperatura en invernáculo.

Una vez que las plantas alcanzaron entre 15 y 25 cm de altura, se ensayaron dos tratamientos del material vegetal (Fig. 3.2.1). Este crecimiento se logró aproximadamente en tres semanas desde la siembra.

Figura 3.2.1: Tamaño de las plantas alcanzado al momento de extracción de ADN.



3.2.a - Cosecha y liofilización de las muestras para la posterior extracción de ADN:

Se cosecharon cinco individuos por entrada con tres a cuatro hojas nuevas y sanas en bolsas plásticas de malla de mosquitero, para permitir una deshidratación rápida y homogénea del tejido. Las muestras fueron conservadas en hielo durante la recolección y posteriormente, liofilizadas durante cuatro a cinco días en un equipo LABCONCO, trabajando a -40°C y 133×10^{-3} bar. Una vez seco, el tejido se conservó a temperatura ambiente dentro de bolsas de plástico termoselladas, para evitar que la rehidratación por efecto de la humedad ambiente produzca degradación del material.

3.2.b - Cosecha y extracción inmediata de ADN:

Se cortaron directamente las dos o tres primeras hojas más jóvenes de cinco individuos por entrada. Esta forma de recolección de tejido vegetal fresco, es la más ampliamente usada para extraer ADN de alta calidad como lo exigen las reacciones de RAPDs y AFLPs.

3.3 - Métodos de extracción de ADN total:

Se compararon tres metodologías de miniextracción de ADN total, utilizando en cada una tejido fresco y liofilizado.

3.3.a - Método A:

Método de Hoisington *et al.* (1994) modificado.

- 1) Colocar nitrógeno líquido en el mortero de porcelana, agregar 150 a 200 mg de tejido fresco (hojas jóvenes) y macerarlo. Recoger el tejido molido y transferirlo con espátula de madera, previamente enfriada, a un tubo de 2 ml enfriado en hielo. (Si se parte de tejido liofilizado trabajar con 50 a 100 mg).
- 2) Agregar al tejido macerado 810 μ l de buffer de extracción calentado a 65°C, mezclar con vortex, calentar la muestra a 65°C, y luego agregarle 90 μ l de solución CTAB (10%), mezclar nuevamente con vortex, e incubarlo a 65°C, durante 30 min. con agitación suave y continua.
- 3) Destapar el tubo durante 5 min., para permitir que la temperatura descienda, y luego agregarle 450 μ l de cloroformo:octanol (24:1 v/v), mezclar la muestra por inversión durante 10 min. hasta obtener una solución visualmente homogénea.

- 4) Luego se centrifuga la solución durante 30 min. a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
- 5) Transvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml, agregar 5 µl de enzima ARNasa (10 mg/ml). Se mezcla la solución suavemente por inversión, durante 5 min., y se incuba 60 min. a 37°C.
- 6) Agregar 450 µl de cloroformo:octanol (24:1). Mezclar suavemente por inversión durante 10 min. hasta obtener una solución visualmente homogénea.
- 7) Centrifugar durante 30 min. a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
- 8) Transvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 1,5 ml.
- 9) Precipitar el ADN agregando rápidamente 600 µl de isopropanol frío (-20°C) y mezclar suavemente por inversión.
- 10) Realizar un *spin* de centrifuga para precipitar la medusa de ADN.
- 11) Descartar el sobrenadante y agregar 500 µl de etanol 70% frío (-20°C), dejarlo durante 30 min., es mejor que el precipitado se desprege para un mejor contacto con el alcohol.
- 12) Descartar el alcohol y dejar secar el precipitado durante 10 a 30 min. en flujo laminar, luego realizar la resuspensión del ADN, dependiendo del rendimiento obtenido, en 50 a 100 µl de agua grado HPLC o buffer TE. Resuspender el ADN a 10°C durante 24 horas para su posterior cuantificación.

Buffer de extracción.

Stock	[Final]	1x (900 µl)
Tris-ClH (pH7,5) 1 M	100 mM	90 µl
ClNa 5 M	700 mM	126 µl
EDTA (pH8) 0,5 M	50 mM	90 µl
βME ¹ 14 M ²	140 mM (1% v/v)	9 µl
Agua deionizada		495 µl
CTAB ³ (10%)	1% (v/v)	90 µl

¹ β-mercaptoetanol, ² [] del producto comercial, ³ Bromuro de Cetiltrimetilamonio.

Preparar la solución de extracción en el momento de usar.

Buffer TE (Tris-EDTA).

Stock	[Final]
Tris-ClH (pH8,0) 1 M	10 mM
EDTA (pH8,0) 0,5 M	1 mM

3.3.b - Método B:

Este método fue establecido en el laboratorio del Instituto de Genética de INTA, Castelar, entre varias metodologías de extracción de tejido vegetal, presentando como variante del método descrito anteriormente los componentes del buffer de extracción.

Buffer de extracción.

Stock	[Final]	1x (750 µl)
Tris-ClH (pH7,5) 1 M	100 mM	75 µl
ClNa 5 M	700 mM	105 µl
EDTA (pH8) 0,5 M	50 mM	75 µl
Agua deionizada		345 µl
CTAB (10%)	1% (v/v)	75 µl
SDS ¹ (20%)	2% (v/v)	75 µl

¹ Dodecilsulfato de sodio.

El detalle de este protocolo es el siguiente:

- 1) 100 a 150 mg de tejido fresco (hojas jóvenes) macerarlo en mortero de porcelana frío y nitrógeno líquido con una punta de espátula de arena, recoger el tejido molido y transvasarlo con espátula de madera, previamente enfriada, a un tubo de 2 ml enfriado en hielo. (Si se parte de tejido liofilizado trabajar con 100 mg).
- 2) Agregar al tejido macerado 600 µl de buffer de extracción calentado a 65°C, mezclar con vortex, calentar la muestra a 65°C, luego agregarle 75 µl de solución CTAB (10%), mezclar nuevamente con vortex y finalmente agregarle 75 µl de SDS (20%), mezclar por inversión e incubarlo durante 30 minutos a 65°C con agitación suave y continua.

Los pasos siguientes no difieren del protocolo descrito en 3.3.a.

3.3.c - Método C:

Método de Rogers y Bendich (1988) modificado.

- 1) Agregar a un tubo de 2 ml, 800 µl de buffer de extracción y mantener en hielo.
Homogeneizar el tejido fresco con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana frío, recoger el tejido molido y transvasarlo con espátula de madera, previamente enfriada, al tubo de 2 ml con el buffer de extracción, la cantidad de tejido debe ser inferior a la mitad del volumen del tubo. Mezclar con vortex e incubar la muestra durante 30 min. a 65°C con agitación suave y continua.
- 2) Destapar el tubo bajo campana hasta que alcance la temperatura ambiente, luego agregarle 800 µl de cloroformo:octanol (24:1). Mezclar suavemente por inversión durante 10 min. hasta obtener una solución visualmente homogénea.
- 3) Centrifugar durante 5 min. a 14000 rpm, a temperatura ambiente.

- 4) Transvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml.
- 5) Agregar 80 μ l de la solución CTAB (10%) y mezclar por inversión durante 15 minutos.
- 6) Agregar 800 μ l de cloroformo:octanol (24:1) y mezclar por inversión durante 10 min. hasta obtener una solución visualmente homogénea.
- 7) Centrifugar durante 5 min. a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
- 8) Transvasar la fase acuosa a un nuevo tubo de 2 ml, agregarle 1000 μ l de buffer de precipitación y mezclar por inversión durante 30 minutos a temperatura ambiente.
- 9) Centrifugar durante 10 min. a 14000 rpm, a temperatura ambiente.
- 10) Descartar el sobrenadante y agregar 400 μ l de ClNa 1 M. Puede requerir calentamiento a 50-60°C para disolver el precipitado del complejo ADN-CTAB.
- 11) Cuando el precipitado se disolvió agregar 5 μ l de enzima ARNasa (10 mg/ml). Mezclar suavemente por inversión e incubar 60 min. a 37°C.
- 12) Centrifugar durante 10 min. a 14000 rpm, a 4°C.
- 13) Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con etanol 70% frío durante 10 min. y centrifugar nuevamente durante 5 min. a 4°C.
- 14) Descartar el sobrenadante y secar el precipitado durante 5 a 15 min. Disolverlo en 50 μ l de agua grado HPLC o buffer TE. Resuspender el ADN a 10°C durante 24 horas para su posterior cuantificación.

Buffer de extracción.

Stock	[Final]
Tris-ClH (pH8) 1 M	50 mM
ClNa 5 M	700 mM
EDTA (pH8) 0,5 M	10 mM
CTAB (10%)	1%(v/v)
β ME 14 M	140 mM (1% v/v)

Autoclavar y conservar a temperatura ambiente, el β ME se debe agregar en el momento de usar.

Buffer de precipitación.

Stock	[Final]
Tris-ClH (pH8) 1 M	50 mM
EDTA (pH8) 0,5 M	10 mM
CTAB (10%)	1% (v/v)

Autoclavar y conservar la solución a temperatura ambiente.

Solución CTAB:

10% de CTAB disuelto en 700 mM de ClNa.

3.4 - Cuantificación del ADN:

Para acelerar la resuspensión total del ADN, las muestras se calentaron en un termobloque a 65°C durante 20 min. Finalizado este tratamiento, se realizaron las diluciones, en agua grado HPLC, 1:10 de los ADN *stocks*. A las nuevas diluciones, también se las mantuvieron durante 24 horas a 10°C para lograr una resuspensión homogénea.

La calidad y cantidad de ADN obtenido se evaluó visualmente por electroforesis en gel sumergido (submarino) de agarosa (BIO-RAD) 0,8% p/v en buffer TBE 1X, conteniendo 1,5 μ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) cada 100 ml de buffer TBE. El ADN se sembró en el gel por inmersión en un volumen final de 12 μ l (4 μ l ADN + 5,5 μ l agua HPLC + 2,5 μ l buffer de carga 5X). Se incluyó como Marcador de Peso Molecular 1 Kb (Gibco BRL) cuya banda de 1600 pa-

res de bases es cuantificable (100 ng/μg). La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0,5X manteniendo 40V constantes. Terminada la electroforesis, el gel fue expuesto en un transiluminador UV (ultravioleta) y fotografiado (Ultra Violet Products Gel Documentation System, Imagen Store 7500, version 7.01) para su documentación final.

El ADN aislado es de buena calidad cuando en el gel se observa como una banda apretada de alto peso molecular ($\geq 40\text{Kb}$). La cuantificación del ADN se realizó por comparación relativa entre la fluorescencia de la banda de 1600 pares de bases del Marcador de Peso Molecular y la banda de ADN a evaluar. Luego de verificar la calidad y evaluar la cantidad de ADN, se ajustaron las concentraciones de las muestras de ADNs para realizar las PCR y los *stocks* fueron conservados a -20°C para preservarlos de la actividad de enzimas ADNasas.

Buffer de carga 5X.

Glicerol	50% v/v
Azul de bromofenol	0,1% p/v
Ficoll 400	2% p/v
EDTA (pH8)	100 mM

Buffer Tris-Borato-EDTA pH8 (TBE).

Buffer	Stock 1000ml		[Final]
TBE	10X: 108 g Tris 0,9 M	1X: Tris	0,090 M
	55 g Ac. Bórico 0,9 M	Ac. Bórico	0,090 M
	40 ml EDTA (pH8) 0,5 M	EDTA	0,002 M
		0,5X: Tris	0,045 M
		Ac. Bórico	0,045 M
		EDTA	0,001 M

3.5 - Reacción de RAPDs (Random-Amplified-Polymorphic DNA):

La reacción de amplificación se optimizó en un volumen final de 15 μ l y se usaron tubos de pared delgada tipo Eppendorf de 200 μ l. Se siguió la metodología standard establecida para RAPDs por Williams *et al.* (1990) con modificaciones. Los componentes de la mezcla de reacción fueron los siguientes:

Reacción de PCR para RAPDs.

Componentes	x tubo (μ l)
Buffer 10X con BSA ¹	1,5
Mezcla 4 dNTPs ² (10 mM)	1,5
Cl ₂ Mg (50 mM)	1,0
Taq ADN polimerasa ³ (5 U/ μ l)	0,2
Oligonucleótidos ⁴ (10 ^{meros} 15 ng/ μ l)	2,0
Agua HPLC	6,8
ADN (5 - 12,5ng)	2,0
	<hr/>
	15 (vol. Total)

¹ 1 mg de Albúmina de Suero Bovino (BSA) / 200 μ l buffer 10X;
² dideoxinucleótidos; ³ Gibco BRL; ⁴ OPERON TECHNOLOGIES.

Buffer 10X.

Tris-ClH (pH8)	200 mM
ClK	500 mM

Las distintas etapas de la incubación se realizaron en un equipo termociclador Techne (Genius) con el siguiente programa;

Programa de amplificación.

Temperatura		Tiempo	
t° desnaturalización total del ADN:	94°C	2 min.	
t° desnaturalización:	94°C	1 min.	} 35 ciclos
t° hibridación del iniciador:	36°C	45 seg.	
t° extensión:	72°C	1 min.	
t° extensión final:	72°C	8 min.	
	8°C	99 horas	

En el programa de amplificación, los cambios de temperatura se efectuaron con las velocidades de transición más rápidas (1°C / seg.).

Para determinar la concentración final de cada componente de la reacción de PCR se utilizaron el iniciador OPB01 (5'-GTTTCGCTCC-3') y el iniciador OPC02 (5'-GTGAGGCGTC-3') (RAPD Primer KITS, OPERON TECHNOLOGIES, INC., Alameda, USA). Los oligonucleótidos de 10 bases de este set se caracterizan por ser elegidos al azar, poseer un contenido de (G+C) entre 60 a 70% y presentar extremos no complementarios. Se eligió el *Kit* de la enzima *Taq* ADN polimerasa Gibco BRL (LIFE TECHNOLOGIES, USA), agregándole al buffer 10X (Albúmina de Suero Bovino), en una concentración de 1 mg BSA / 200 µl buffer 10X, para estabilizar la actividad de la enzima polimerasa en los sucesivos cambios de temperatura durante el ciclado.

En todas las reacciones se realizó un control negativo, colocando para ello en un tubo todos los componentes de la reacción excepto el ADN, el cual fue reemplazado por igual volumen de agua. La ausencia de amplificación en este control asegura que la amplificación observada en el resto de los tubos es debida al ADN de la muestra y no a la presencia de contaminantes en los componentes de la reacción o en los materiales empleados.

Para observar los productos de amplificación, se preparó un gel de agarosa 2,0% p/v en buffer TBE 1X, conteniendo 1,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por 100 ml de buffer TBE. Con el gel sumergido en buffer por inmersión

se sembraron 10 µl del volumen de reacción junto con 2 µl de buffer de carga 5X. Se utilizó como Marcador de Peso Molecular 1 Kb (Gibco BRL). La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0,5X, mantenida a 60V constantes. Una vez finalizada la electroforesis de los fragmentos amplificados, el gel fue expuesto en un transiluminador UV y fotografiado para su documentación.

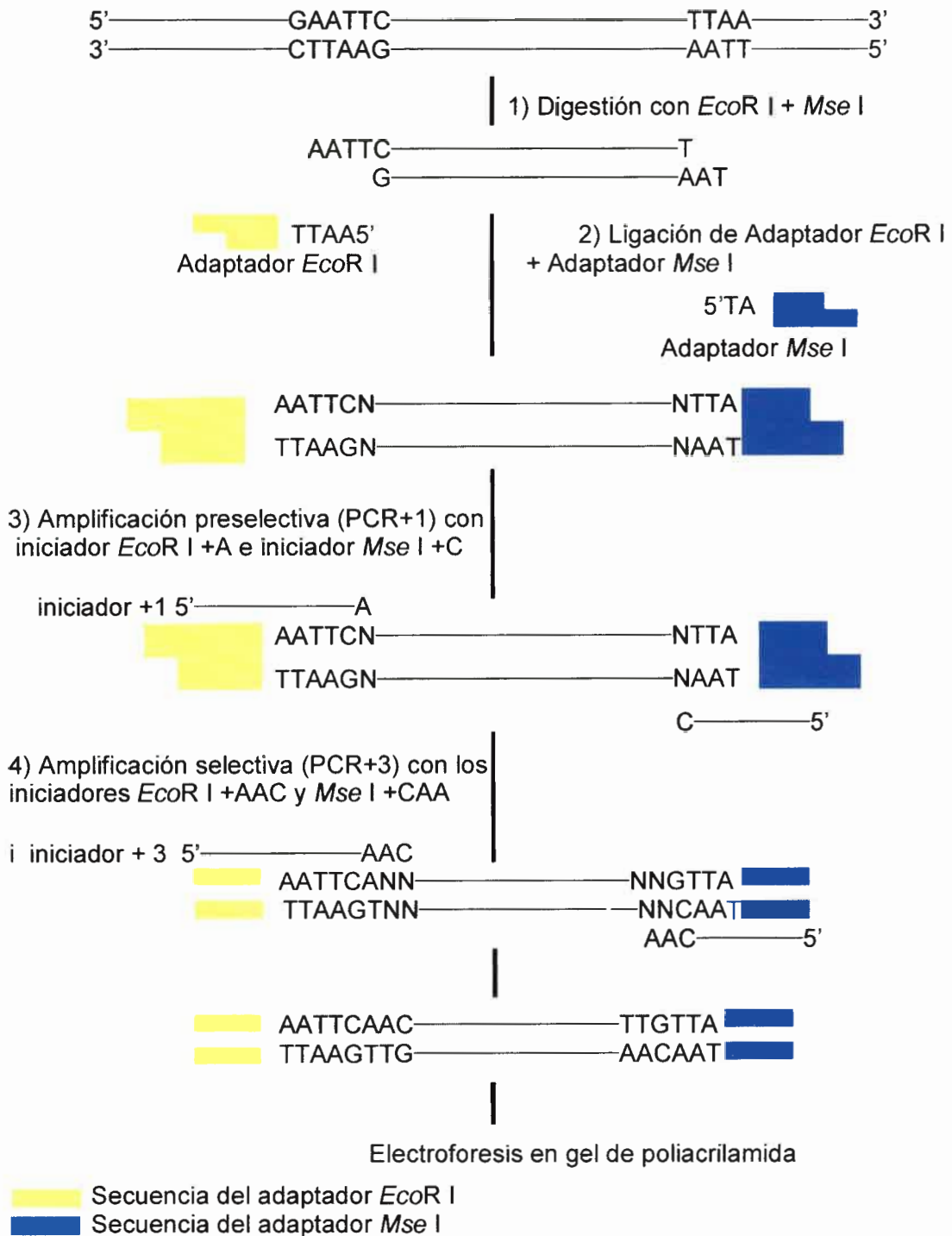
3.6 - Reacción de AFLPs (Amplified-Fragment-Length-Polymorphisms):

Se siguió la técnica desarrollada por Vos *et al.* (1995), con modificaciones.

Etapas de la técnica (Fig. 3.6.1):

- 1) Digestión del ADN
- 2) Ligación de los adaptadores
- 3) Pre-amplificación selectiva o PCR +1
- 4) Amplificación selectiva o PCR +3

Figura 3.6.1: Esquema que resume el procedimiento de AFLP con un par de iniciadores, según Lin *et al.* (1995).



1) Digestión del ADN:

Se utilizaron 750 ng de ADN genómico, en un volumen final de 30 μ l por cada entrada. El ADN se digirió con las endonucleasas de restricción *EcoR* I (G/AATTC) y *Mse* I (T/TAA). La reacción de digestión se llevó a cabo en un buffer en el cual la actividad de ambas enzimas es alta y no provoque falsos sitios de cortes del ADN, afectando la repetibilidad de la técnica; se utilizó para ello un buffer universal llamado RL.

Buffer RL.

Stock	[Final]
Tris-Ac ¹ (pH 7,5) 1 M	50 mM
AcMg 1 M	50 mM
AcK 1 M	250 mM
DTT ¹ 0,1 M	25 mM
BSA (10 mg / ml)	25 ng / ml
Agua HPLC	

¹A. Acético, ² Dithiothreitol.

Reacción de digestión.

Componentes	X tubo (μ l)
Buffer RL	10
<i>EcoR</i> I (10 U / μ l)	0,75
<i>Mse</i> I (10 U / μ l)	1,25
ADN (25 ng / μ l)	29
Agua HPLC	20,44

Estos 65 μ l de volumen final se incubaron durante 5 hs. a 37°C, en ciclador Techne PROGENE; al finalizar este tiempo se procedió a realizar la segunda etapa que consistió en la ligación de los adaptadores.

2) Ligación de los adaptadores:

En esta etapa se liga a los extremos cohesivos de los fragmentos de ADN, obtenidos tras la digestión con las dos enzimas de restricción, pequeños oligonucleótidos de doble cadena y de secuencia conocida. Estos oligonucleótidos, denominados adaptadores, consisten en una secuencia de bases nucleotídicas central y una secuencia especificada por el sitio de corte de cada enzima (Zabeau y Vos, 1993).

La estructura del adaptador *EcoR* I es: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC
CATCTGACGCATGGTTAA-5'

La estructura del adaptador *Mse* I es: 5'-GACGATGAGTCCTGAG
TACTCAGGACTCAT-5'

Reacción de ligación de los adaptadores.

Componentes	x tubo (µl)
Buffer RL5X	2,0
Adaptador <i>EcoR</i> I (5 pMol / µl)	1,0
Adaptador <i>Mse</i> I (50 pMol / µl)	1,0
ATP (10 mM)	1,2
ADN Ligasa	1,0
ADN digerido	65
Agua HPLC	3,8

La ligación se realizó a 4°C durante 48 hs.

3) Pre-amplificación o PCR +1.

Finalizada la etapa de ligación, se realizó la primera amplificación selectiva por PCR. La estructura de los iniciadores de AFLP consiste en tres partes,

una secuencia central (SC), una secuencia especificada por el sitio de corte de la enzima (ENZ) y una secuencia de extensión selectiva (ES) (N: nucleótidos seleccionados) (Zabeau y Vos, 1993).

(SC) (ENZ) (ES)

La estructura del iniciador *EcoR I* es: 5'-GACTGCGTACC AATTC NNN-3'

La estructura del iniciador *Mse I* es: 5'-GATGAGTCCTGAG TAA NNN-3'

Cada base nucleotídica agregada al extremo 3' de los iniciadores reduce en un factor de 16 los fragmentos amplificados de los productos obtenidos en la ligación. De modo que los productos obtenidos luego de cada PCR, constituyen un subgrupo de los fragmentos producidos en la reacción de ligación.

Reacción PCR +1.

Componentes	x tubo (µl)
Buffer sequencing grade 5X	5,0
Iniciador <i>EcoR I</i> + 1 (100 ng / µl)	0,75
Iniciador <i>Mse I</i> + 1 (100 ng / µl)	0,75
Cl ₂ Mg (25 mM)	1,32
Mezcla 4 dNTPs (10 mM)	0,5
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U / µl) ¹	0,2
ADN (ligación)	2,0
Agua HPLC	14,48

¹ sequencing grade, Promega.

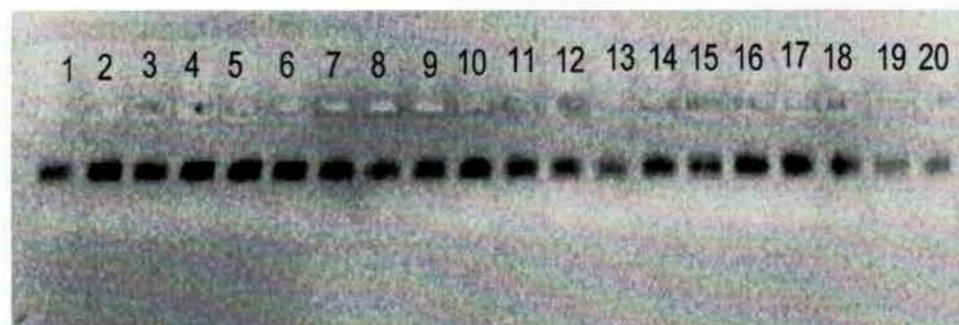
Se utilizó para realizar la reacción de amplificación un ciclador Techne PROGENE, con las siguientes condiciones:

Programa de amplificación.

Temperatura	Tiempo
T° desnaturalización total del ADN: 94°C	2 min.
T° desnaturalización: 94°C	30 seg.
T° hibridación de los iniciadores: 56°C	30 seg.
T° extensión: 72°C	1 min.
T° extensión final: 72°C	10 min.
8°C	99 horas

Para verificar que se produjo amplificación en la PCR +1, se preparó un gel de agarosa 2,0% p/v en buffer TBE 1X, conteniendo 1,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ ml) por 100 ml de buffer TBE. Una vez sumergido el gel por inmersión se sembraron 3 µl del volumen de reacción con 0,6 µl de buffer de carga 5X. La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0,5X mantenida a 40V constantes. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue expuesto en un transiluminador UV (ultravioleta) y fotografiado (Fig. 3.6.2). A los 22 µl restantes de la PCR +1 se les agregó 198 µl de buffer TE 0,1X, (dilución 1:10).

Figura 3.6.2: Negativo del gel con los productos amplificados en la PCR +1.



1 Don Guiem, 2 Don Armando, 3 G10/13l, 4 G14, 5 G14/4, 6 G6, 7 G2/1, 8 G6/19, 9 G6/2, 10 G1, 11 G1/3, 12 Artasa, 13 G6/1, 14 G1/3b, 15 Don Juan, 16 G16/12l, 17 G16183/14, 18 G14/14a, 19 G16186/16, 20 G10/3.

4) Amplificación selectiva o PCR +3.

En esta reacción ocurre una nueva amplificación selectiva de los fragmentos de ADN producidos en la pre-amplificación o PCR +1. Para ello, los

nuevos iniciadores presentan en el extremo 3' de sus secuencias, dos bases nucleotídicas más que los iniciadores utilizados en la amplificación anterior. Reduciendo en este caso 64 veces el número de bandas que serán amplificadas del total obtenido originalmente en la reacción de ligación. De este modo se logra tener una población de fragmentos (aproximadamente 50 a 100) que pueden ser resueltos y detectados en geles desnaturalizantes de poliacrilamida.

Reacción PCR +3.

Componentes	x tubo (μ l)
Buffer 10X	2,2
Iniciador <i>EcoR</i> I +3 (100 ng / μ l)	0,3
Iniciador <i>Mse</i> I+ 3 (100 ng / μ l)	0,3
Cl_2Mg (25 mM)	1,4
Mezcla 4 dNTPs (10 mM)	0,4
<i>Taq</i> ADN polimerasa (5 U / μ l) ¹	0,3
ADN (PCR +1)	0,5
Agua HPLC	16,6

¹ Promega.

Buffer 10X:

Tris-ClH (pH9) 100 mM

ClK 500 mM

Triton X-100 (1% v / v)

Se utilizó un ciclador Techne GENIUS, con estas condiciones de amplificación:

Programa de amplificación.

Temperatura		Tiempo	
T° desnaturalización total del ADN:	94°C	2 min.	} 1 ciclo
T° desnaturalización:	94°C	30 seg.	
T° hibridación de los iniciadores:	65°C	30 seg.	
T° extensión:	72°C	1 min.	
T° extensión final:	72°C	10 min.	
	8°C	99 horas	

Luego se repiten 12 ciclos iguales al anterior, pero con una disminución de la temperatura de hibridación de los iniciadores de 0,7°C por ciclo, hasta llegar a una temperatura final de hibridación de 56°C. Cumplida esta etapa, el proceso continúa con el siguiente programa.

Programa de amplificación.

Temperatura		Tiempo	
t° desnaturalización:	94°C	30 seg.	} 30 ciclos
t° hibridación de los iniciadores:	56°C	30 seg.	
t° extensión:	72°C	1 min.	
t° extensión final:	72°C	10 min.	
	8°C	99 horas	

Una vez finalizada la reacción de amplificación a los 22 µl de volumen final, se les agrega un volumen igual de buffer de carga, quedando de esta manera la mezcla lista para su electroforesis.

Buffer de carga.

Formamida	95% v/v
Azul de bromofenol	0,05% p/v
Xilenecyanol	0,05% p/v
NaOH	10 mM

Los productos de la amplificación ocurrida en la PCR +3, se separan en

un gel del tipo de secuenciación. A continuación se detalla el acondicionamiento de los vidrios donde se sostiene el gel y la composición del gel propiamente dicho.

Los vidrios deben ser meticulosamente lavados con Alconox Inc. Liquid-Nox® (detergente en polvo no iónico) y agua destilada. Luego se lavan y enjuagan con agua deionizada para remover los residuos del detergente, siendo el último lavado con etanol. El vidrio móvil de la cuba se trata con Bind-Silano (γ -methacryloxy-propyl-trimethoxysilane) para que el gel se adhiera covalentemente al mismo y poder realizar el tratamiento de revelado con nitrato de plata.

Al vidrio portador del gel, se lo unta con:

Alcohol	950 μ l
Ácido Acético Glacial	50 μ l
Bind Silano	3 μ l

Reposar durante 3 min.

Posteriormente, se lava al vidrio 3 veces con 1 ml de alcohol en sentido perpendicular, entre lavado y lavado, a intervalos de 3 min. cada uno.

Al vidrio fijo, se lo trata con Repel Silano (Rain X®) que crea una capa impermeable siliconada que impide que el gel se adhiera. Se arma la cuba en posición horizontal (38 x 30 cm BIO-RAD). Luego se inyecta la solución del gel con jeringa de manera suave y continua, evitando la formación de burbujas.

Para la preparación del gel, se disuelve 25,2 g de urea¹ en:

Agua deionizada	10 ml
Buffer TBE 10X	6 ml
30% Acrilamida:Bisacrilamida (19:1)	12 ml

¹ Para lograr la disolución de la urea se debe emplear agitación y calor.

Lograda la disolución de la urea, enrazar a volumen final de 60 ml, con agua deionizada. Mantener en hielo y luego filtrar.

La polimerización de la solución se produce agregando 60 μ l de TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethyldiamina) más 60 μ l de Persulfato de amonio (APS) (25%, 15 mg / 60 μ l de agua deionizada), como catalizador, inmediatamente antes de colocarla en el molde.

Para realizar la electroforesis, se ensamblan las distintas partes de la cuba, llenando la cuba superior, que es paralela a la superficie donde se apoya el gel, con buffer TBE 0,5X y en la cuba inferior con buffer TBE 1X. Posteriormente se elimina la urea que difundió en la parte superior del gel. Antes de sembrar las muestras se realiza una precorrida a 1000 voltios para calentar el gel a 55 - 60°C.

Mientras transcurre la precorrida del gel, se realiza el tratamiento de las muestras de la PCR +3 más el buffer de carga. Para lograr la desnaturalización total de los productos amplificados, se calientan las muestras durante 5 min. a 95°C y luego se mantienen en hielo hasta el momento de la siembra. Como Marcadores de Peso Molecular se utilizaron 100 pb (Promega) y 20 pb (Bio-Rad).

Una vez lograda la temperatura adecuada del gel, se vuelve a eliminar la urea difundida, se inserta el peine y siembra 6 μ l de cada muestra. La corrida electroforética se realiza a 45 watts y a 50°C. La duración de la electroforesis es hasta que el segundo marcador (Xilenecyanol) haya migrado 30 cm desde la línea de siembra. Finalmente se desensambla la cuba y se separan los vidrios, incubando el gel en ácido acético 10% durante 20 min., hasta que desaparecen los colorantes del buffer de carga. El gel se puede conservar durante 5 a 6 días en esta solución.

El revelado del gel se realiza por el método de tinción con nitrato de plata, el cual se describe a continuación:

1) Lavados:

Se realizan dos lavados en agua destilada con agitación suave durante 5 minutos cada uno. Luego se lava con agua deionizada durante 5 min. Estos lavados se realizan para eliminar el exceso de ácido acético.

2) Coloración:

Incubar al gel durante 30 min. en una solución de nitrato de plata (1 g/l) y formaldehído (37%) 3 ml, en agitación suave. El formaldehído en la solución mejora la sensibilidad y el contraste. Este reduce la plata a baja velocidad, produciendo una nucleación alrededor del sustrato a teñir favoreciendo así el posterior depósito de la plata en el lugar. Cumplido el tiempo se escurre colocando el vidrio vertical sobre papel absorbente.

3) Lavado:

Sumergir durante 5 seg., con agitación suave, en agua deionizada.

4) Revelado:

Preparar una solución de carbonato de sodio anhidro (30 g/l), formaldehído (37%) 3 ml y tiosulfato de sodio (10 mg/ml) 200 µl/l. El formaldehído y el tiosulfato se deben agregar en el momento de usar. Al momento de revelar el gel la solución debe estar a una temperatura entre 8 a 10°C. Se incuba al gel, con agitación suave, en la mitad de la solución de revelado, cuando comienzan a aparecer las primeras bandas se agrega el resto de la solución.

5) Fijación:

La fijación del gel se realiza durante 20 min. en ácido acético 10%.

6) Lavado:

Se realizan dos lavados en agua destilada durante 10 min. cada uno.

7) Posteriormente se deja escurrir y deshidratar el gel durante 24 horas.

Es importante que todas las soluciones sean preparadas en el momento de emplearlas y en cantidad suficiente para cubrir al gel.

Existen varias metodologías para conservar los geles de poliacrilamida. Entre ellas, se probó pegar al gel en un papel secante como también fotografiarlo.

Pegado del gel en papel secante:

1) Incubar al gel en una solución básica de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio 2,5 M, el cual remueve al Bind Silano; este paso se realiza sin agitación. El tiempo de incubación es hasta que alguno de los bordes del gel comienza a despegarse del vidrio.

2) Se retira el vidrio de la solución y se lava la superficie del gel con agua destilada para remover el exceso de hidróxido.

3) Posteriormente se cubre al gel con papel Whatmann (3 mm) y se pasa un rodillo para eliminar las burbujas de aire entre el papel y el gel.

4) Se comienza a levantar con suavidad uno de los extremos del papel, junto con el cual se despegará el gel adherido.

5) Se cubre el gel con un film transparente y hornea al vacío a una temperatura de 80°C durante 2 horas, en un desecador de geles.

Fotografía con APC Film:

Esta técnica requiere de un cuarto oscuro y de un transiluminador con luz fluorescente. Los tiempos de exposición dependen de la intensidad de luz

emitida por el transiluminador, por lo que deben ponerse a punto para cada equipo en particular. La experiencia obtenida, en este trabajo, se describe a continuación:

- 1) En el cuarto oscuro, ubicar el vidrio que sostiene al gel sobre el transiluminador. La superficie del gel debe estar hacia arriba.
- 2) En oscuridad, colocar el film con la emulsión en contacto con el gel.
- 3) Colocar un vidrio limpio sobre el film para asegurar un contacto homogéneo entre el gel y el film.
- 4) Encender la luz del transiluminador y exponer al film durante 1 min.
- 5) Revelar el film en oscuridad de la siguiente manera:
 - Revelar durante 50 seg. en revelador Kodak® GBX.
 - Lavar en agua deionizada durante 1 min.
 - Fijar durante 3 min. En solución fijadora Kodak® GBX.
 - lavar en agua deionizada durante 1 min.(Todos los pasos se hacen con agitación suave).
 - Secar a temperatura ambiente.

3.7 - Interpretación del perfil de bandas y Análisis de los datos:

Como ya se mencionó el análisis de los datos tiene por finalidad determinar las relaciones genéticas y posibilitar la identificación de las 20 entradas consideradas.

3.7.1 - Características y Codificación de las bandas:

Los RAPDs y los AFLPs corresponden a un tipo de marcador molecular determinado por la lectura de un patrón de bandas observadas por electroforesis en gel. Con estos marcadores se pueden establecer los fenotipos de presencia y ausencia del producto de amplificación, que se codifican 1 y 0, respectivamente. En consecuencia, cada banda o fragmento amplificado corresponde a un carácter cualitativo clasificado como dato binario o también llamado de doble estado (Crisci y Lopez Armengol, 1983).

En cada amplificación individual cada banda se denominó por el iniciador que la originó seguida por un número. La banda o carácter ubicado más cerca del cátodo fue designado como carácter 1 y los productos subsecuentes hacia el ánodo 2, 3..., etc. y así sucesivamente. Esta designación fue realizada para todas las bandas obtenidas por cada iniciador y en todas las entradas analizadas.

En cada grupo de datos, obtenidos por las técnicas de RAPD o AFLP, se emplearon todos los productos amplificados de definición nítida y repetible en dos experimentos independientes, en las 20 entradas. De esta manera se elaboró una matriz básica, de forma rectangular, que contuvo en las columnas a todas las entradas a ser caracterizadas y en las filas a los caracteres (Crisci y Lopez Armengol, 1983).

3.7.2 - Determinación de las relaciones genéticas:

Para expresar de manera cuantitativa el parecido entre distintos genotipos existen varios coeficientes de similitud. Estos coeficientes son operaciones matemáticas que permiten calcular las similitudes o las diferencias entre entradas. A todos ellos se los puede dividir en cuatro grupos: de distancia, de correlación, de asociación y de similitud probabilística (Sneath y Sokal, 1973).

El tipo de estadístico aplicable a un grupo de datos, para el análisis de las relaciones genéticas entre entradas, depende específicamente del tipo de datos evaluados. Los coeficientes de asociación miden las coincidencias y las diferencias en los estados que toman los caracteres entre dos entradas. Esta medición exige específicamente caracteres de tipo doble estado.

Al comparar dos entradas para un carácter doble estado pueden presentarse cuatro posibilidades: que las dos presenten el carácter comparado, que sólo una u otra lo presente, o bien que el carácter esté ausente en ambas (Fig. 3.7.1).

Figura 3.7.1: Posibles combinaciones que pueden presentarse al comparar dos genotipos para un carácter del tipo doble estado.

		Genotipo X	
		carácter 1	0
Genotipo Y	1	1,1	1,0
	0	0,1	0,0

En la mayoría de los análisis genéticos, con datos doble estado, se utilizan medidas que ignoran, al comparar dos genotipos, la doble ausencia del carácter evaluado (0,0), como componente a favor de similitud. El índice de Nei y Li (Nei y Li, 1979) también conocido como índice de DICE (Dice, 1945) y el índice de Jaccard (Jaccard, 1908) son los coeficientes más ampliamente usados como medidas de similitud en análisis genéticos y ambos ignoran la doble ausencia de banda a favor de la similitud.

En este trabajo se emplearon ambos índices en la estimación de las relaciones genéticas. Éstas se logran comparando los genotipos de a pares mediante los coeficientes de asociación. Los valores de asociación obtenidos con estos estadísticos varían entre 0 correspondiendo al valor de mínima similitud y 1 cuando la similitud es máxima.

Coefficiente de asociación de Jaccard:

$$J_{xy} = n_{11} / (n - n_{00}) = n_{11} / (n_{11} + n_{01} + n_{10})$$

Coefficiente de asociación de Nei y Li o de DICE:

$$NL_{xy} = 2n_{11} / (2n_{11} + n_{01} + n_{10})$$

Donde n = número total de bandas, n_{11} = número de bandas de igual peso molecular compartidas por las entradas x e y , n_{00} = número de bandas presentes en el total y ausentes en las entradas x e y , n_{01} = número de bandas ausentes en la entrada x y presentes en la entrada y , n_{10} = número de bandas presentes en la entrada x y ausentes en la entrada y .

Se generó así una nueva matriz de similitud, de forma triangular. Esta matriz contiene a los coeficientes de asociación obtenidos entre pares de entradas, siendo la diagonal principal la comparación de cada entrada consigo misma por lo que toma el valor 1 de máxima similitud. Para expresar las relaciones genéticas entre la totalidad de las entradas, con la matriz de similitud se practicó una técnica de agrupamiento llamada del ligamiento promedio (UPGMA, "Unweighted pair-group method using arithmetic averages"). Esta técnica identifica en la matriz de similitud original a las entradas que comparten el mayor valor de similitud y las agrupa en un núcleo. El valor de similitud que toma el núcleo se calcula como la media aritmética no ponderada entre los valores de similitud de las entradas que lo forman. Se genera así una nueva matriz de similitud derivada. La matriz de similitud derivada se caracteriza por ser de menor tamaño que la original debido a la fusión de entradas en núcleos cuando son dos y grupos cuando se unen más de dos entradas. El núcleo formado será considerado como una unidad con respecto al resto de las entradas, en la siguiente búsqueda del máximo coeficiente de similitud compartido. Este procedimiento se repite sucesivamente, hasta lograr que todos los núcleos constituyan un único grupo que contenga a todas las entradas (Crisci y Lopez Armengol, 1983). La representación gráfica del agrupamiento practicado a la matriz de similitud se esbozó en una estructura arborescente o fenograma.

Mediante el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson (r) se estableció el grado de correspondencia entre dos matrices simétricas de similitud.

$$r = [n (\sum XY) - (\sum X) (\sum Y)] / \sqrt{[n \sum X^2 - (\sum X)^2] [n \sum Y^2 - (\sum Y)^2]}$$

X e Y son todos los valores de las matrices X e Y , exceptuando la diagonal principal.

Cuando la comparación se estableció entre la matriz cofenética originada a partir de los valores del fenograma y la matriz de similitud propiamente dicha, el coeficiente se denominó de correlación cofenético (Sokal y Rohlf, 1962).

Otra manera de expresar las relaciones genéticas entre entradas es mediante el método de ordenación de coordenadas principales. Para ello, la matriz de similitud es doblemente centrada mediante:

$$\alpha_{jm} = a_{jm} - a_j - a_m + a$$

Donde a_j y a_m son la fila y la columna correspondiente al elemento a_{jm} de la matriz de similitud. De esta manera se centran las entradas en una nube de puntos más o menos concéntrica, en función de la varianza, preservando las relaciones de similitud establecidas entre ellas.

Los elementos de la diagonal de la matriz centrada son las distancias al cuadrado de cada entrada al centroide del espacio. Posteriormente se calculan los valores y vectores propios por ecuaciones de dos incógnitas. La suma de los valores propios constituye la varianza total de las entradas para los caracteres utilizados. Estos determinan las coordenadas principales y se proyectan en gráficos de dos o tres dimensiones. La posición en el gráfico de cada entrada está determinada por el valor de su vector propio.

La diferencia de este método con el análisis de agrupamientos es que otorga más libertad en la expresión gráfica de las relaciones genéticas establecidas en la matriz de similitud, debido a que no traza límites en el espacio que separen grupos. Las relaciones entre las entradas están determinadas por la posición en que se disponen en un espacio reducido.

Todas estas matrices se procesaron empleando el programa NTSYS-pc, Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System version 2.0 (Rohlf, 1998).

3.7.3 - Identificación:

El establecimiento de un único *fingerprint* para identificar a cada uno de los 20 genotipos diferentes fue definido por múltiples bandas de RAPDs y AFLPs, los que posiblemente representen múltiples loci génicos. Esto es muy importante en la caracterización de cultivares, debido a que un cultivar no es definido por un único marcador sino por muchos de ellos (Nicese *et al.*, 1998).

Cada uno de los productos amplificados de RAPDs y AFLPs fue interpretado como un locus, por representar a un segmento específico en un cromosoma y como alelos a las dos formas alternativas que toman estos caracteres. La definición de locus y alelos fue acuñada por primera vez a partir de la definición de gen. Un gen es toda unidad transcripcional. Pudiendo codificar entre sus variantes a una proteína. En cambio los marcadores RAPDs y AFLPs corresponden a regiones codificantes y no codificantes del genoma. Por lo tanto, el empleo del término locus en este estudio se hace en un sentido amplio y sólo implica un segmento de ADN.

Para evaluar la capacidad de los dos sistemas de marcadores moleculares en distinguir las entradas de amarantos aquí analizadas se emplearon dos medidas de comparación.

A) El cociente múltiple define el número de loci o bandas analizadas en un experimento. Ésta es una de las medidas que permite estimar la capacidad de una técnica de marcadores moleculares aplicada en discernir diferencias entre genotipos de una o varias especies. Los marcadores RAPDs y AFLPs comparados con los RFLPs y SSRs (Simple Sequence Repeats), son los que definen generalmente un mayor número de bandas simultáneas por experimento, definiendo así un mayor cociente múltiple (Powell *et al.*, 1996).

B) El grado de polimorfismo capaz de detectar un marcador molecular determinado está dado por el índice de contenido polimórfico (PIC) (Powell *et al.*, 1996). Corresponde a la probabilidad de que dos alelos tomados al azar en una población puedan ser diferenciados por el sistema de marcadores elegido.

$$PIC_{locus} = 1 - \sum p_i^2$$

p_i es la frecuencia del alelo i en los genotipos analizados.

$$PIC_{sistemamolecular} = \sum PIC_{locus} / N$$

N es el total de loci obtenidos en cada sistema de marcador molecular.

4 - RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 - Extracción de ADN total:

Se emplearon dos formas de manipular el material vegetal previo a la extracción y tres métodos de purificación en miniescala del ADN total de amaranto. Se encontró una diferencia sustancial en la calidad del ADN según el modo en que el tejido fue utilizado, fresco o liofilizado (figura 4.1.1) y no con el método de extracción en sí (figura 4.1.2). Como se puede observar, en la electroforesis en gel de agarosa de las figuras 4.1.1 y 4.1.2, en los extractos provenientes de tejido liofilizado, junto con el ADN, también precipitaron una gran cantidad de moléculas contaminantes, posiblemente en su mayoría se trate de polisacáridos.

Figura 4.1.1: Negativo del gel con los ADNs extraídos de amaranto según los tres protocolos ensayados.

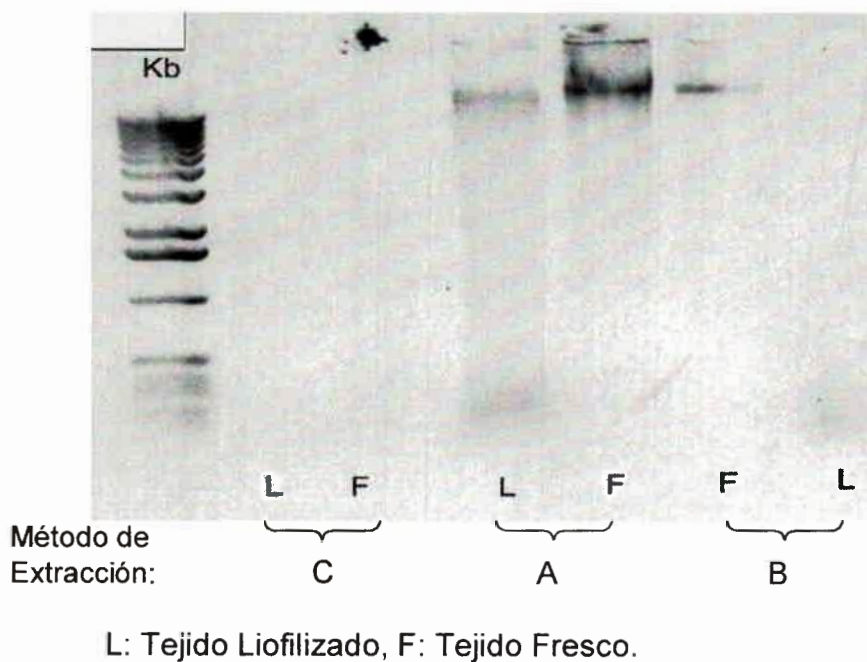
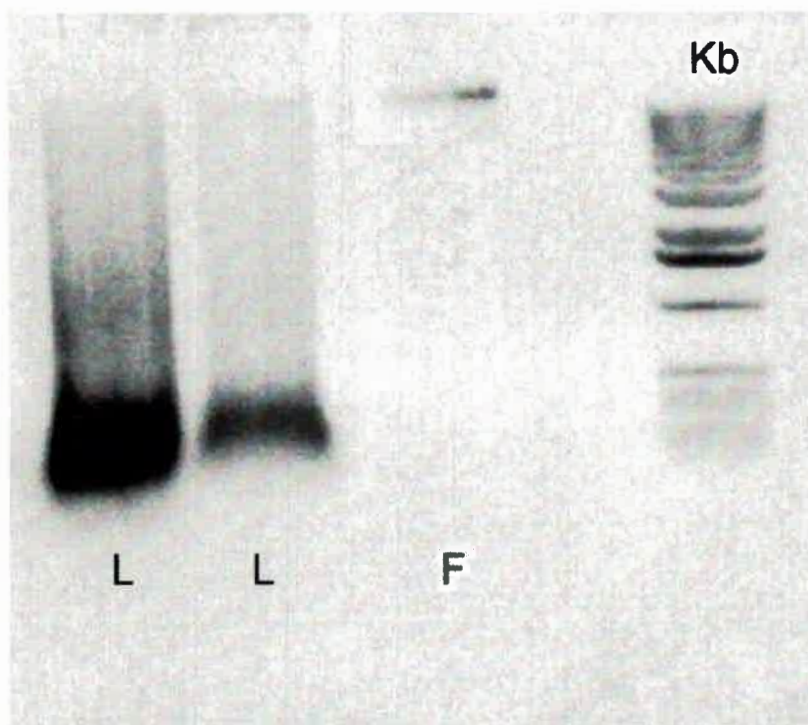


Figura 4.1.2: Negativo del gel con los ADNs extraídos de amaranto, a partir de tejido fresco y liofilizado, usando la metodología Hoisington *et al.* (1994) (A).



L: Tejido Liofilizado, F: Tejido Fresco.

Los rendimientos de la extracción de ADN, a partir de tejido fresco, no difirieron entre la metodología de Hoisington *et al.* (1994) (A) y el protocolo resumen (B). En ambos, en un volumen final de suspensión de 40 μl , se logró un rendimiento promedio de ADN de 150 a 250 $\text{ng}/\mu\text{l}$ para todos los materiales. En cambio, al utilizar el método propuesto por Rogers y Bendich (1988) (C) se obtuvo muy poca cantidad de ADN, en un orden 15 veces inferior al rendimiento anterior, siendo el tamaño del precipitado menor a 3 mm^2 . Posiblemente este bajo rendimiento estuvo asociado con pérdidas durante la doble precipitación que emplea esta metodología para lograr ADN de alta calidad. Por otra parte la cantidad de ADN obtenida, en todas las metodologías, a partir de tejido liofilizado, estuvo en órdenes de 5 a 10 veces menores que la extraída de tejido fresco. El interés de poner a punto un protocolo de extracción de ADN en amaranto a partir de material liofilizado, radica en la posibilidad de cosechar y conservar el material a temperatura ambiente, otorgando una mayor flexibilidad en los tiempos de laboratorio cuando el número de muestras es grande y, prescin-

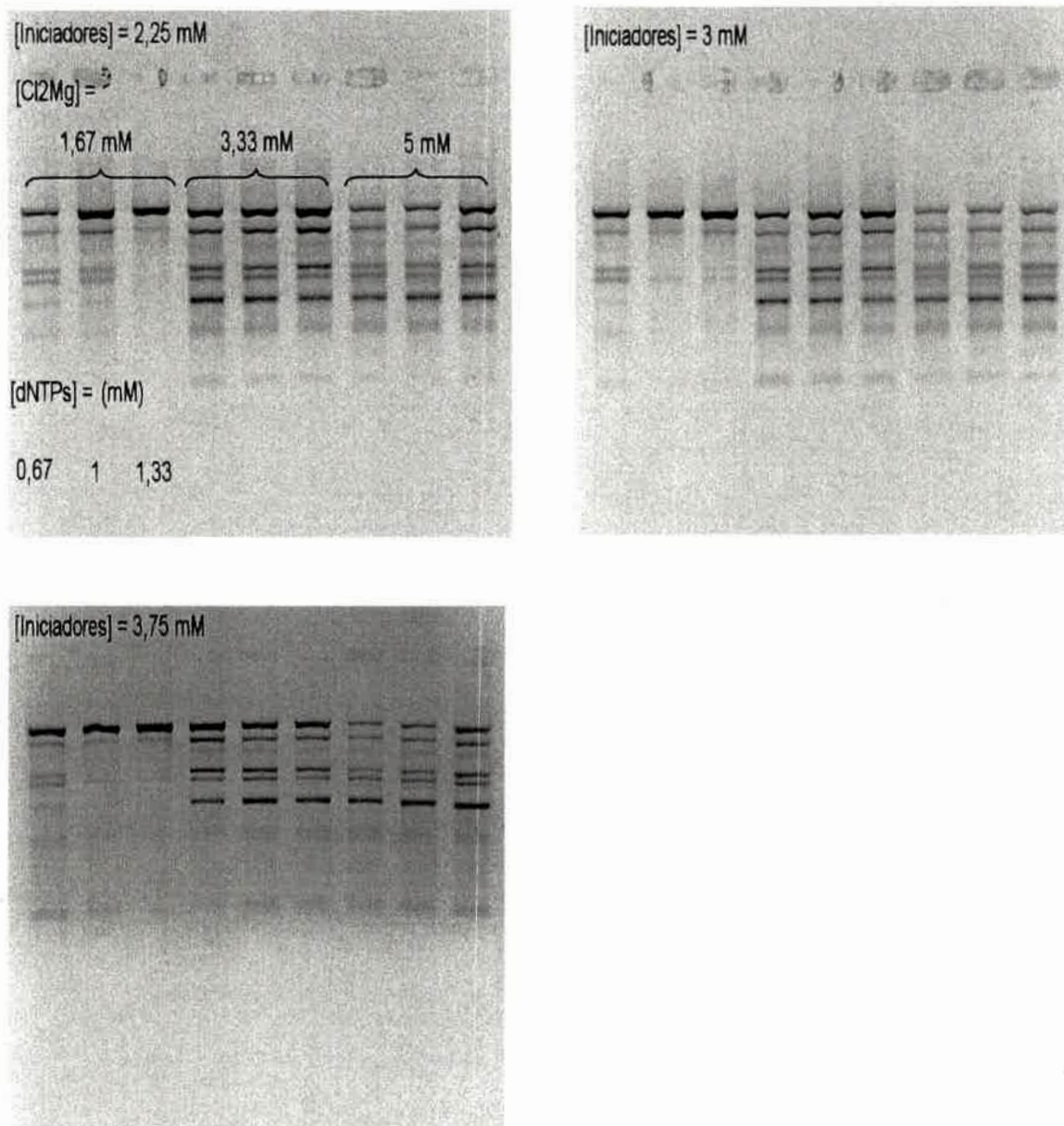
dir de la necesidad de frío para almacenar el material como ocurre al trabajar con tejido fresco.

A partir de estos resultados preliminares se escogió, para la extracción de ADN, trabajar con tejido fresco debido a la necesidad de contar con ADN de alta calidad en las reacciones de amplificación de RAPDs y en la digestión y amplificación en la técnica de AFLPs, y se eligió el protocolo descrito previamente por Hoisington *et al.* (1994), junto con las variantes sugeridas en materiales y métodos, por su mayor simplicidad. De esta manera, se puso a punto una metodología rápida de extracción de ADN de amaranto, que requiere poca cantidad de material fresco (100 a 150 mg) y además con la que se obtiene suficiente cantidad y calidad de ADN, para las reacciones de RAPDs y AFLPs, obviando el empleo de gradientes de cloruro de cesio para obtener ADN de calidad en amaranto, como lo citan para trabajar con estas especies Chan y Sun (1997).

4.2 - Reacción de amplificación de RAPDs:

Para establecer las condiciones óptimas de amplificación por PCR se realizó un experimento factorial variando las concentraciones de Cl_2Mg , dNTPs e iniciadores. El arreglo incluyó la combinación de: tres concentraciones de Cl_2Mg (1,67, 3,33 y 5 mM), tres concentraciones de 4 dNTPs (0,67, 1 y 1,33 mM) y tres concentraciones de iniciadores (22,5, 30 y 37,5 ng). Se empleó el iniciador OPC02 y una concentración de 15 a 25 ng de ADN (Fig. 4.2.1).

Figura 4.2.1: Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos como resultado del experimento factorial entre distintas concentraciones de Cl_2Mg , dNTPs e iniciadores.



De acuerdo a lo observado en la figura anterior, en las 27 combinaciones ensayadas la concentración de Cl_2Mg fue la que afectó en mayor grado los patrones de RAPDs. La menor concentración de Cl_2Mg (1,67 mM) independientemente de la concentración de dNTPs e iniciadores mostró el patrón con el menor número de bandas y a la vez menos reproducible. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Williams *et al.* (1993) trabajando con ADN de

soja. La concentración de magnesio y la temperatura de *annealing* son las que afectaron la intensidad relativa de las bandas. A bajas concentraciones de este ión, todas las bandas fueron más tenues, produciendo el efecto de pocas bandas en el gel como se observa en la figura 4.2.1. Estos autores sugieren que la concentración óptima de magnesio debe probarse en cada aplicación particular, siendo los rangos más adecuados de 1 a 4 mM y recomiendan utilizar 36°C como la temperatura óptima de *annealing* para iniciadores de 10 nucleótidos. Estos autores también han demostrado, que a diferencia del magnesio, los dNTPs y los iniciadores no afectan la intensidad relativa de bandas en un amplio rango de concentraciones. En este experimento las concentraciones de dNTPs y de iniciadores probadas tampoco afectaron la intensidad relativa de bandas.

El número de bandas o fragmentos amplificados se incrementó con el aumento en la concentración de iniciadores y magnesio, aunque éstos no fueron nítidos ni reproducibles. Parecería que la reacción de PCR comienza a ser más inespecífica al aumentar la concentración de magnesio sobre cierto límite, y este efecto se potenciaría cuando los iniciadores en exceso se unen a sitios del ADN con una homología menor al 100%.

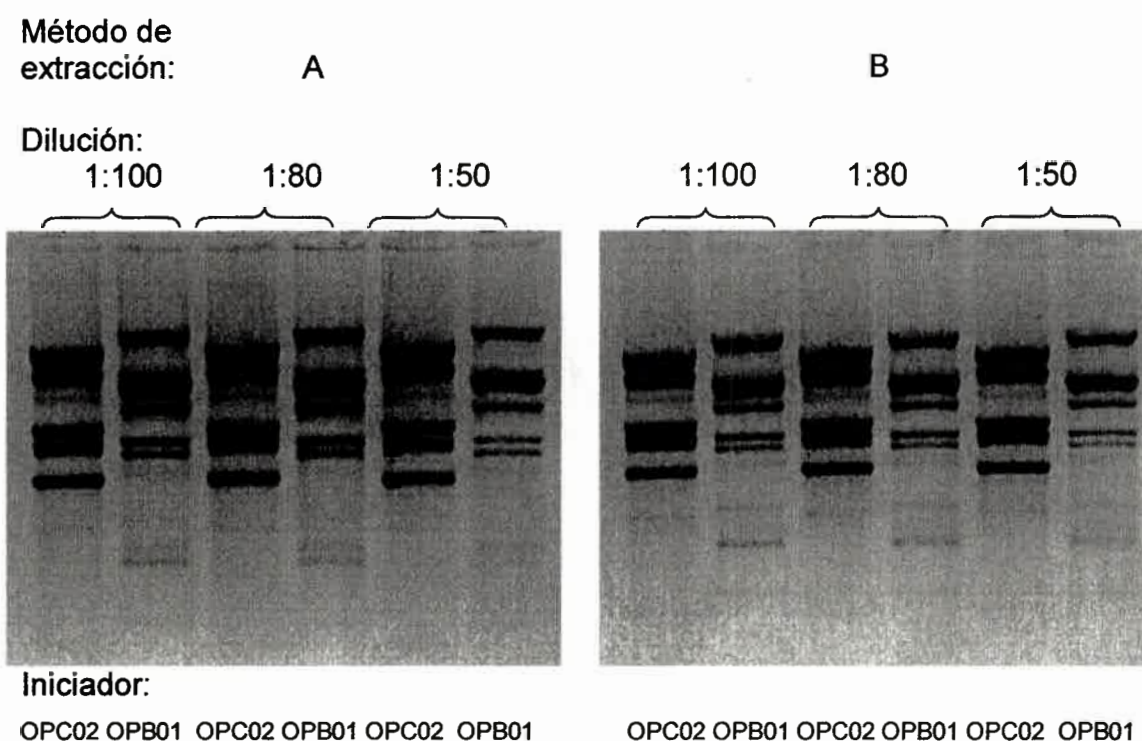
Finalmente, las combinaciones de 3,33 mM Cl_2Mg con 22,5 y 30 ng de iniciadores y las tres concentraciones de dNTPs fueron las que amplificaron bandas más intensas y reproducibles, pudiéndose optar por cualquiera de estas seis combinaciones para la reacción de RAPDs en amaranto.

La segunda estrategia de optimización, fue mantener constante la combinación seleccionada de: $Cl_2Mg = 3,33$ mM, 4 dNTPs = 1 mM e iniciadores = 30 ng, y esta vez hacer variar la concentración de ADN para dos iniciadores distintos.

Para ello se realizaron diluciones de ADN, en agua grado HPLC, de 1:50, 1:80 y 1:100 de la dilución de cuantificación (1:10 *stock*). Siguiendo el

programa de incubación descrito en materiales y métodos, se emplearon 2 µl de cada nueva dilución para una primera reacción de amplificación. En la figura 4.2.2 se observan los fenotipos de RAPDs utilizando los iniciadores OPB01 y OPC02 en las diluciones de ADNs aislados según los dos primeros protocolos en tejido fresco.

Figura 4.2.2: Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con los iniciadores OPB01 y OPC02 a partir de muestras de ADNs extraídas con el protocolo de Hoisington *et al.* (1994) y el protocolo resumen.



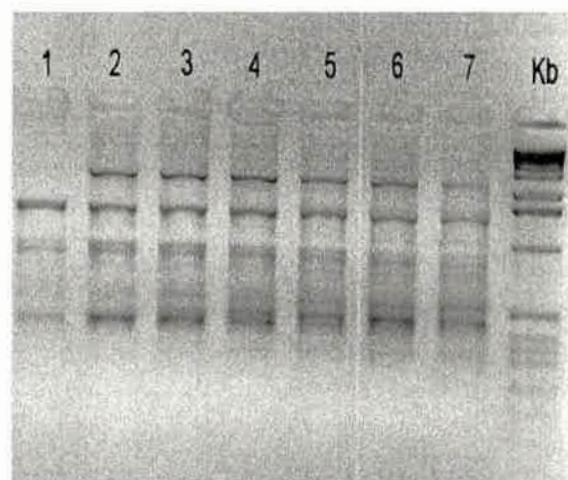
En esta figura se puede apreciar la reproducibilidad de los patrones de amplificación con los ADNs extraídos independientemente según las metodologías A y B. Además al comparar los patrones de bandas del iniciador OPC02 en las figuras 4.2.1 y 4.2.2 se puede contar con la seguridad de que, en un margen de diluciones de trabajo de 1:10 hasta 1:100 del ADN *stock* y manteniendo constantes las concentraciones del resto de los componentes de la reacción, se logra el mismo patrón de bandas. Este resultado es particularmente importante para la repetibilidad de la técnica de RAPDs entre laboratorios. Debido a que si los fenotipos de RAPDs son muy influenciados por pe-

queños cambios en los componentes en la mezcla de la reacción, la reproducibilidad de los patrones se verá seriamente comprometida (Weeden *et al.*, 1992), teniendo en cuenta que la concentración de ADN es uno de los parámetros más difíciles de estimar.

Pensando en la necesidad de procesar un gran número de muestras diarias, como lo requiere el análisis para la identificación de muestras en laboratorio, con estos resultados se puede estimar la dilución necesaria de ADN de acuerdo al tamaño del precipitado y realizar directamente las amplificaciones de PCR sin cuantificarlo previamente, acortando de esta manera los tiempos experimentales.

A pesar de la diferencia en calidad observada en el gel de cuantificación de los ADNs extraídos a partir de tejido liofilizado, también se realizó con ellos una prueba de amplificación. En la figura 4.2.3 se demuestra los patrones de bandas obtenidos con diluciones de 1:50 de los ADNs *stocks* y el iniciador OPB01.

Figura 4.2.3: Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos con el iniciador OPB01 y ADNs extraídos a partir de tejido liofilizado.



Muestras 1 a 7 distintos ADNs al azar.

A diferencia de lo que ocurrió con los ADNs provenientes de tejido fresco, en esta figura se puede observar la poca reproducibilidad en los patrones de fragmentos amplificados con ADNs aislados a partir de tejido liofilizado, independientemente de la metodología empleada, resultado que concuerda con la mala calidad de ADN ya observada previamente en gel.

Williams *et al.* (1993) han observado que, en el caso de RAPDs la cantidad y no la calidad de la molécula de ADN puede ser la limitante de las amplificaciones obtenidas. Estos autores han probado diferentes protocolos de extracción de ADN para reacciones de RAPDs, pudiendo lograr amplificaciones adecuadas hasta con aquellos métodos con los que no se obtiene ADN de alto peso molecular. La limitante con los protocolos que no realizan varios pasos de purificación, ya sea para eliminar proteínas, polifenoles o polisacáridos es que éstos, dependiendo del organismo u órgano empleado, pueden presentarse en concentraciones elevadas en el volumen final de la reacción de PCR y de esta forma afectar las amplificaciones. Estos autores sugieren para los vegetales, extraer ADN de tejidos frescos y jóvenes, y emplear en el orden de 5 a 50 ng de ADN en volúmenes finales de reacción de 20 a 25 μ l.

En la bibliografía de amarantos graníferos, se han realizado algunos análisis de RAPDs (Chan y Sun, 1997; Ranade *et al.*, 1997; Transue *et al.*, 1994). Estos autores han empleado, no sólo diferentes protocolos de extracción de ADN, sino también distintos programas de ciclado y diversas concentraciones de los componentes de la reacción de PCR, en volúmenes finales de 15 a 25 μ l para obtener sus propios patrones de RAPDs en estas especies; no obstante sus conclusiones concuerdan con lo propuesto por Williams *et al.* (1993) y con los resultados experimentales logrados en este trabajo.

4.3 - Variación Intra-poblacional evaluada con marcadores

RAPDs:

Para estimar la homogeneidad genética de cada entrada se utilizaron los iniciadores OPA15, OPB01, OPB15, OPC02 y OPD15. Estos iniciadores fueron elegidos por producir patrones de bandas nítidas y a la vez diferentes entre entradas de las distintas especies.

El número de plantas individuales que debería considerarse para representar la variabilidad de los cultivares está relacionado con la frecuencia de los marcadores en la población y con el criterio de homogeneidad establecido (Yang y Quiros, 1993). Estimar la frecuencia de los marcadores en una población requiere de la medición de un gran número de individuos y de marcadores. Esta estimación a su vez depende de la complejidad genética del cultivar a evaluar. La complejidad genética de un cultivar es determinada primeramente por el método con el cual fue creado, por ejemplo es de esperar que los genotipos de los individuos de un cultivar producido por la tecnología de doble haploide sean idénticos, mientras que los individuos de los cultivares producidos por métodos tradicionales tales como la selección masal a partir de una población, en una especie alógama, presenten diferencias. Además se puede producir un aumento de la heterogeneidad del cultivar durante el mantenimiento del mismo, si las condiciones de aislamiento no son controladas cuidadosamente, en especies alógamas (Dulson *et al.*, 1998). Teniendo en cuenta que los amarantos son predominantemente autógamos y que estos materiales son cultivares o líneas experimentales avanzadas de un programa de mejoramiento, seleccionados a partir de poblaciones pequeñas que ya habrían sufrido mejoramiento selectivo (ver 3.1) por uniformidad de caracteres de importancia agronómica, es de esperar que estos materiales posean una gran homogeneidad siendo pequeña la heterogeneidad entre los individuos de cada uno.

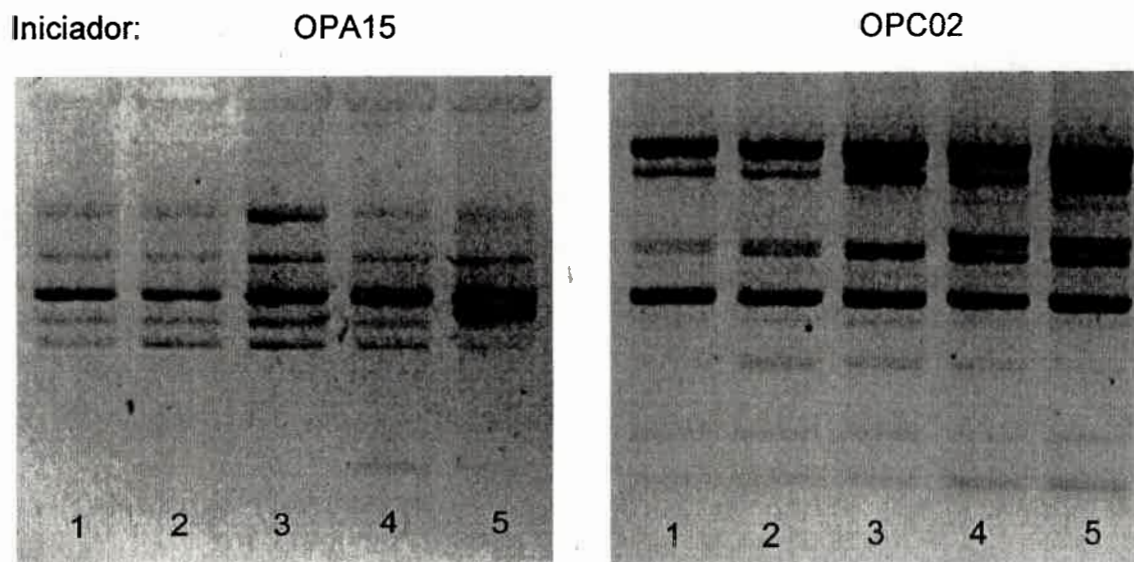
El tamaño óptimo de una muestra para representar a un cultivar depende en las especies autógamas de la homogeneidad del cultivar y del número de

marcadores utilizados, siendo necesario aumentar el número de los individuos analizados cuando la complejidad genómica del cultivar es mayor (Dulson *et al.*, 1998; Hill *et al.*, 1996; Yang y Quiros, 1993). Las conclusiones de estos trabajos establecieron que 5 a 20 individuos son suficientes para representar a un cultivar de una especie autógama homogénea. En este trabajo se utilizaron cinco plantas individuales como representantes de cada entrada, debido a la homogeneidad morfológica observada previamente en ensayos a campo entre los individuos de cada una de ellas, después de cinco a siete generaciones de autofecundación controlada (G. Peiretti comunicación personal).

Las reacciones de amplificación con los cinco iniciadores analizados determinaron un total de 53 fragmentos de ADN reproducibles.

En las entradas Don Armando, Don Guiem, G10/13I, G14, G14/4, G6, G6/2, G2/1, G6/19, G1, G1/3, Artasa, G6/1, G1/3b, Don Juan, 16186/16, G16/12I y G14/14a los cinco individuos presentaron el mismo patrón de amplificación. En cambio, en las líneas experimentales G16183/14 y G10/13, se encontraron variaciones en los fragmentos de ADN entre los individuos evaluados. En la línea G16183/14 se observaron dos patrones de amplificación diferentes con el iniciador OPB01 y en la línea G10/13 con los iniciadores OPA15 y OPC02 (Fig. 4.3.1), se observaron también dos patrones de bandas entre las cinco plantas. Estos patrones diferentes tampoco concordaron con los establecidos en alguno de los otros 18 genotipos. El nivel de polimorfismo, estimado por estos 53 marcadores RAPDs, en las líneas G16183/14 y G10/13, fue inferior al 5%. Estas bandas polimórficas pueden convertirse, en el futuro, en herramientas útiles como marcadores genéticos intra-específicos (Quiros *et al.*, 1991; Williams *et al.*, 1990).

Figura 4.3.1: Negativo correspondiente a los polimorfismos observados en la línea G10/13 con los iniciadores OPA15 y OPC02.



Esta evaluación permite establecer que los RAPDs son lo suficientemente sensibles como para ser empleados en la caracterización de poblaciones de amarantos a partir de plantas individuales.

Las líneas experimentales y los cultivares mostraron ser lo suficientemente homogéneos con los 53 marcadores empleados en este estudio (pureza ≥ 95). Este resultado es consistente con el hecho de que estas especies son autógamas y además, con la homogeneidad morfológica evaluada previamente en estos cultivares y líneas experimentales. Pudiendo, con estos resultados, considerar a cada uno de ellos con un genotipo propio y representarlo por los ADNs cuantificados, de las cinco plantas individuales para las posteriores reacciones de RAPDs y AFLPs. Esta poca variación encontrada dentro de cada entrada, propio en los materiales mejorados de especies autógamas, hace pensar en la posibilidad de encontrar mayores diferencias entre cultivares que provienen de una misma población original, como ocurre en muchos de los materiales mejorados de amarantos graníferos.

4.4 - Variación inter-poblacional evaluada con marcadores

RAPDs:

En la determinación de la variación inter-poblacional con marcadores RAPDs, cada ADN individual contribuyó con 100 ng para representar el genotipo propio de cada entrada. La estimación de las distancias genéticas, inter-poblacionales, se realizó utilizando los fragmentos RAPDs obtenidos por 67 iniciadores elegidos al azar (Cuadro 4.4.1). Cada iniciador fue evaluado en dos experimentos de amplificación independiente para probar la reproducibilidad en los patrones de bandas. Sólo aquellas bandas intensas y de límites claros fueron computadas en cada reacción individual.

Del total de iniciadores, OPA16, OPA17, OPB03, OPB04, OPB09, OPB16, OPC03, OPC09, OPC16, OPC17, OPD03, OPD04, OPD06, OPD09, OPD16, OPD17 y OPD19 no mostraron productos de amplificación en las condiciones establecidas en materiales y métodos. Quizás para estos iniciadores haya que establecer nuevas combinaciones de los distintos componentes de la mezcla de reacción. Al comparar sus secuencias, porcentajes de G+C y las distribuciones de bases con aquellos iniciadores que mostraron productos de amplificación, no se observan diferencias (Cuadro 4.4.1).

Con los 50 iniciadores que amplificaron fragmentos del ADN de amaranto, se obtuvo un total de 687 bandas o marcadores RAPDs nítidos y reproducibles. De los cuales 526, que corresponden al 76,6%, mostraron polimorfismo en al menos uno de los genotipos estudiados.

El número de bandas por iniciador varió entre 1 (OPC06) a 29 (OPA18), con un promedio de 13,7 bandas / iniciador. En todas las combinaciones iniciador - genotipo, la mayoría de los fragmentos mostraron un tamaño entre 200 a 2500 pares de bases.

En el cuadro 4.4.1 se detallan las secuencias, como así también el número de loci logrados en el total de entradas para los 67 iniciadores analizados en este estudio. En este cuadro también se incluye entre paréntesis el número de bandas polimórficas para cada iniciador. Siendo el porcentaje promedio de loci polimórficos por iniciador RAPD igual al 69,8 %.

Cuadro 4.4.1: Código, secuencia y número de bandas obtenidas con los 67 iniciadores.

Oligo ¹	Secuencia (5'-3')	Nº de bandas	Oligo	Secuencia (5'-3')	Nº de bandas
OPA01	CAGGCCCTTC	21 (20)	OPC04	CCGCATCTAC	13 (10)
OPA03	AGTCAGCCAC	15 (11)	OPC05	GATGACCGCC	18 (10)
OPA04	AATCGGGCTG	09 (06)	OPC06	GAACGGACTC	01 (—)
OPA05	AGGGGTCTTG	08 (—)	OPC08	TGGACCGGTG	08 (07)
OPA08	GTGACGTAGG	18 (18)	OPC09	CTCACCGTCC	—
OPA09	GGGTAACGCC	14 (13)	OPC10	TGTCTGGGTG	11 (10)
OPA10	GTGATCGCAG	19 (07)	OPC12	TGTCATCCCC	17 (11)
OPA12	TCGGCGATAG	14 (10)	OPC13	AAGCCTCGTC	13 (13)
OPA13	CAGCACCCAC	26 (16)	OPC14	TGCGTGCTTG	27 (24)
OPA14	TCTGTGCTGG	16 (14)	OPC15	GACGGATCAG	05 (03)
OPA15	TTCCGAACCC	10 (09)	OPC16	CACACTCCAG	—
OPA16	AGCCAGCGAA	—	OPC17	TTCCCCCAG	—
OPA17	GACCGCTTGT	—	OPC18	TGAGTGGGTG	13 (10)
OPA18	AGGTGACCGT	29 (24)	OPC19	GTTGCCAGCC	08 (—)
OPA19	CAAACGTCGG	19 (15)	OPC20	ACTTCGCCAC	16 (14)
OPA20	GTTGCGATCC	11 (07)	OPD01	ACCGCGAAGG	13 (09)
OPB03	CATCCCCCTG	—	OPD03	GTCGCCGTCA	—
OPB04	GGA CTGGAGT	—	OPD04	TCTGGTGAGG	—
OPB05	TGCGCCCTTC	18 (16)	OPD05	TGAGCGGACA	05 (—)
OPB06	TGCTCTGCCC	17 (11)	OPD06	ACCTGAACGG	—
OPB09	TGGGGGACTC	—	OPD07	TTGGCACGGG	05 (02)
OPB10	CTGCTGGGAC	17 (14)	OPD08	GTGTGCCCCA	14 (13)
OPB12	CCTTGACGCA	06 (04)	OPD09	CTCTGGAGAC	—
OPB13	TTCCCCCGCT	08 (07)	OPD10	GGTCTACACC	20 (19)
OPB14	TCCGCTCTGG	11 (07)	OPD12	CACCGTATCC	04 (03)
OPB15	GGAGGGTGTT	15 (11)	OPD13	GGGGTGACGA	15 (10)
OPB16	TTTGCCCGGA	—	OPD14	CTTCCCCAAG	05 (01)
OPB17	AGGGAACGAG	20 (17)	OPD15	CATCCGTGCT	13 (10)
OPB18	CCACAGCAGT	22 (22)	OPD16	AGGGCGTAAG	—
OPB19	ACCCCGAAG	06 (06)	OPD17	TTTCCCACGG	—
OPB20	GGACCCTTAC	09 (07)	OPD18	GAGAGCCAAC	24 (17)
OPC01	TTCGAGCCAG	07 (06)	OPD19	CTGGGGACTT	—
OPC02	GTGAGGCGCT	09 (06)	OPD20	ACCCGGTCAC	25 (13)
OPC03	GGGGGTCTTT	—			

¹RAPD Primer KITS, OPERON TECHNOLOGIES, INC., Alameda, USA.() Número de fragmentos polimórficos por iniciador, observados en al menos una entrada.

La expresión de los marcadores RAPDs en las distintas entradas se muestra en el anexo 4.4.1 en forma de una matriz de c (columnas) x f (filas). Esta matriz de doble entrada, contiene en sus columnas a las 20 entradas y en las filas a los 687 marcadores de ADN. Cada marcador fue denominado por el nombre del iniciador y un número. Cada casillero de la matriz representa el estado presencia o ausencia codificado por 1 o 0 del carácter para una entrada, respectivamente.

Ciertas bandas fueron comunes a todas las especies, mientras que algunas bandas estuvieron presentes en unas y ausentes en otras. Las figuras 4.4.1 y 4.4.2 muestran los patrones de amplificación obtenidos para las 20 entradas utilizando como ejemplo los iniciadores OPC12 y OPD13, respectivamente.

Figura 4.4.1: Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con el iniciador OPC12 en las 20 entradas de amaranto.

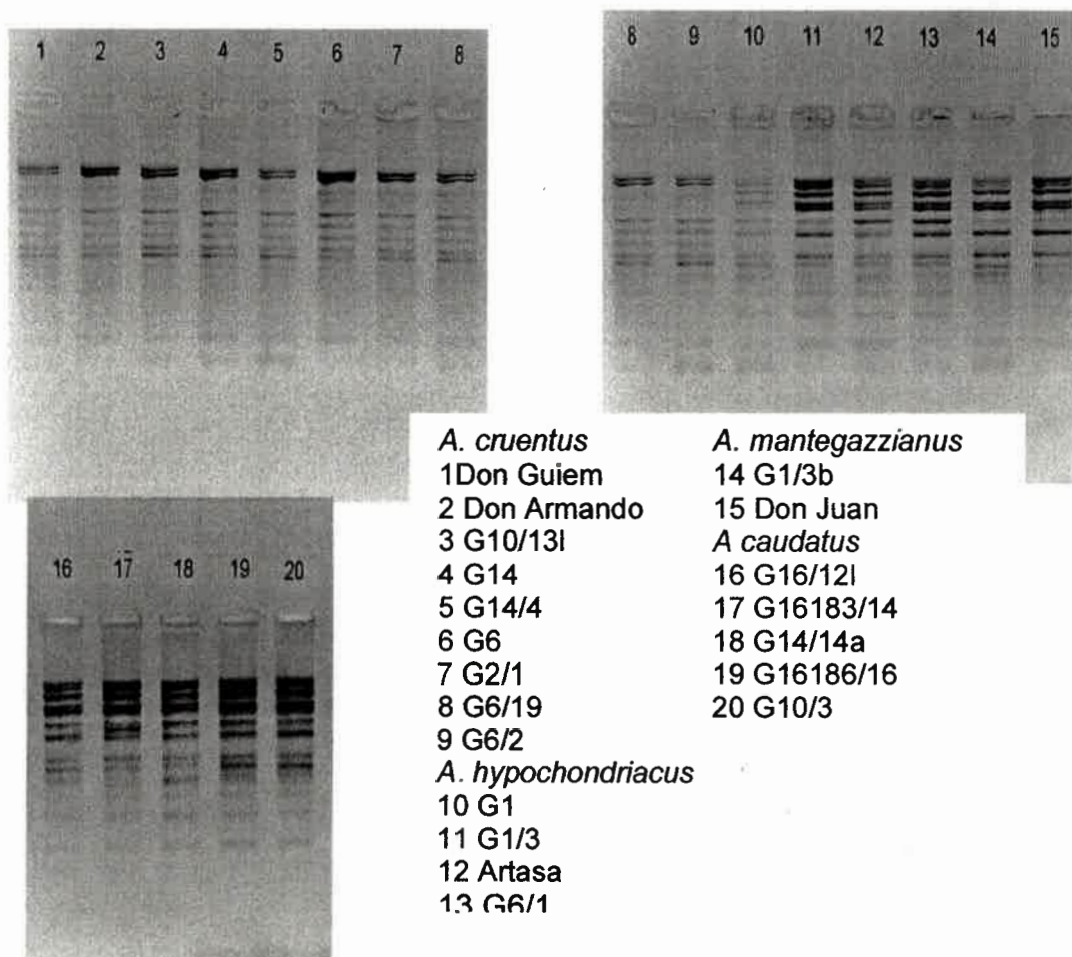
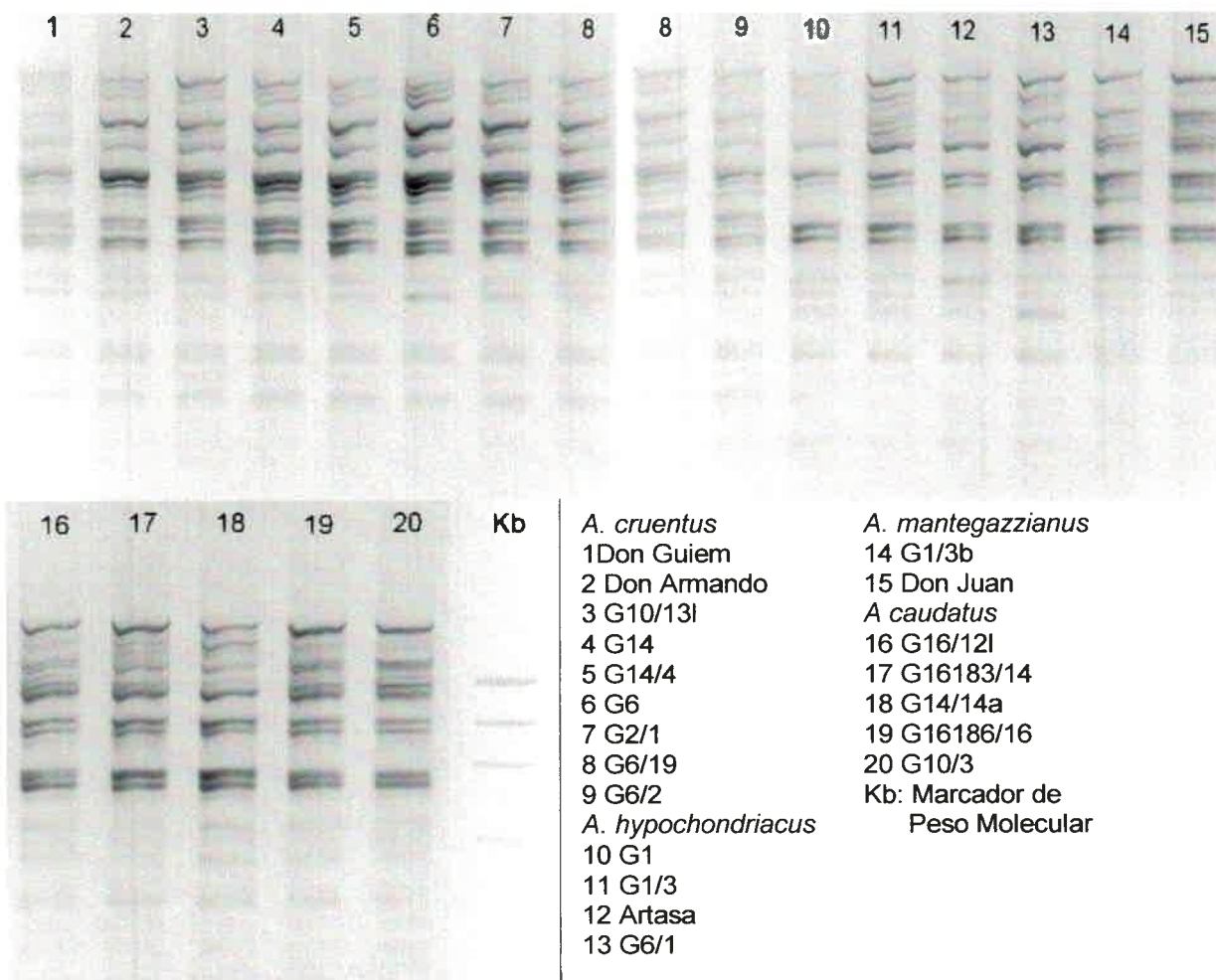


Figura 4.4.2: Negativo de las bandas de RAPDs amplificadas con el iniciador OPD13 en las 20 entradas de amaranto.

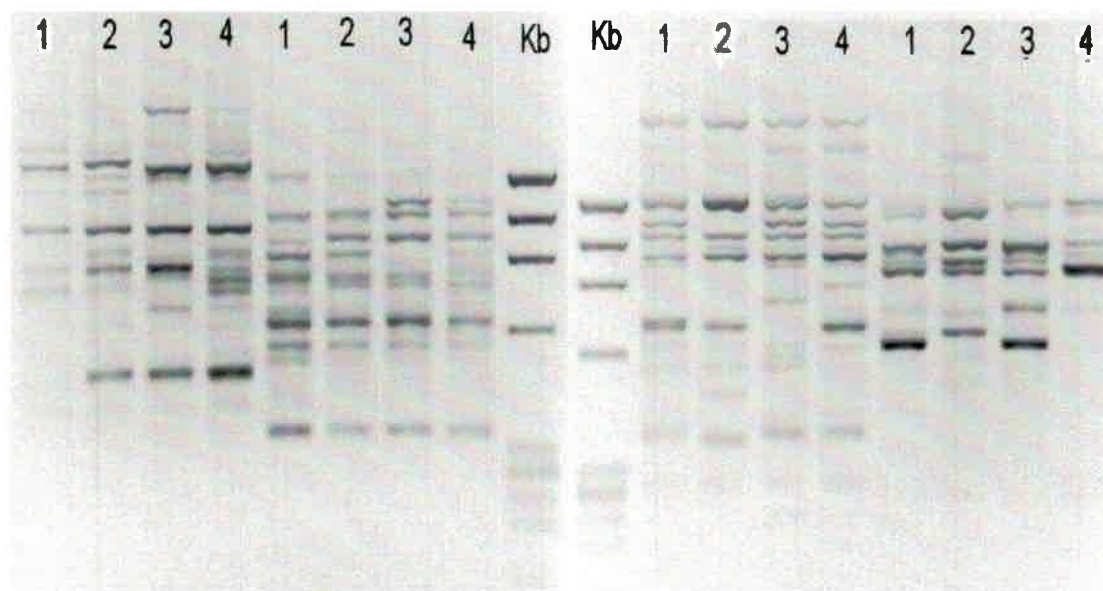


El 55,75% de los productos de amplificación fueron compartidos entre las cuatro especies. De acuerdo a los porcentajes de marcadores moleculares compartidos entre pares de especies, las entradas aquí analizadas de *A. mantegazzianus* y las de *A. caudatus* demostraron ser genéticamente las más similares con un 62,15% de fragmentos de igual peso molecular. Mientras que para el resto de las comparaciones entre pares de especies un 30 a 40% de los marcadores RAPDs fueron de igual peso molecular.

Con diferentes grupos de iniciadores fue posible determinar fragmentos inter-específicos únicos (Fig. 4.4.3). En la muestra analizada el polimorfismo intra-específico fue menor, siendo el porcentaje de productos monomórficos

dentro de: *A. cruentus* 98,13%, en *A. hypochondriacus* 83,61%, en *A. mantegazzianus* 99,72% y en *A. caudatus* 85,12%.

Figura 4.4.3: Negativo de los patrones de RAPDs obtenidos con distintos iniciadores en una entrada de cada especie.



Iniciador:

OPA18

OPB18

OPA03

OPB17

1- Entrada de *A. cruentus*, 2- Entrada de *A. hypochondriacus*,
3- Entrada de *A. caudatus*, 4- Entrada de *A. mantegazzianus*.
Kb: Marcador de Peso Molecular.

Al aplicar los coeficientes de asociación de Nei y Li y el de Jaccard, con el programa NTSYS-pc 2.0 (Rohlf, 1998) a la matriz básica detallada en el anexo 4.4.1 se generaron nuevas matrices triangulares llamadas de similitud (figuras 4.4.4 y 4.4.5). El valor de la diagonal principal de esta matriz corresponde a la comparación de cada entrada consigo misma, por lo que equivale entonces al máximo valor de similitud 1.

En la extensa bibliografía de estudio para la caracterización de cultivares vegetales se utilizan indistintamente ambos índices con datos provenientes de RAPDs, AFLPs, RFLPs e isoenzimas (Bhat *et al.*, 1994; Fjellstrom y Parffit, 1994; Harris, 1995; Kongkiatngam *et al.*, 1995; Nicese *et al.*, 1998; Paran *et al.*, 1998; Sun *et al.*, 1998; Wilkie *et al.*, 1993).

Los índices de Nei & Li y de Jaccard, se diferencian porque el primero le otorga un peso doble a la posibilidad de que ambas entradas presenten al carácter comparado. Por ello, ha sido sugerido (Link *et al.*, 1995; Piepho y Laidig, 1997) que es más apropiado utilizar para datos de RFLPs e isoenzimas el índice de Nei y Li, mientras que para caracteres de RAPDs y AFLPs el índice de Jaccard. La razón descrita por Piepho y Laidig (1997), es que los marcadores RAPDs y AFLPs al ser en su mayoría dominantes determinan la presencia o ausencia de una banda en cierta posición, correspondiendo usualmente cada posición de banda a un locus. En cambio, los marcadores RFLPs e isoenzimas por ser codominantes producen fragmentos de tamaños variables dados por diferentes alelos. Para dos cultivares que difieren en la constitución genética de un locus marcador, los alelos producen dos fragmentos, difiriendo en la posición que toman en el gel. En cambio, si los dos genotipos son idénticos para dicho locus al ser analizados con marcadores codominantes, los dos alelos se manifestarán con sólo una banda en el gel, siendo conveniente darle en este caso un peso doble como lo expresa el índice de Nei y Li.

Figura 4.4.4: Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Jaccard a las 20 entradas, utilizando caracteres RAPDs.

	G14/4	D.Guiem	G6/2	G14	G2/1	G10/13l	G6/19	D.Arm.	G6	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan	G1/3b	G16183/14	G14/14a	G16/12l	G16186/16	G10/3
G14/4	1																			
D.Guiem	.989	1																		
G6/2	.984	.994	1																	
G14	.992	.992	.992	1																
G2/1	.984	.994	1	.992	1															
G10/13l	.986	.997	.992	.989	.992	1														
G6/19	.986	.997	.992	.989	.992	1	1													
D.Arm.	.986	.997	.997	.994	.997	.994	.994	1												
G6	.978	.989	.989	.986	.989	.992	.992	.992	1											
G1	.497	.502	.503	.501	.503	.500	.500	.504	.506	1										
G6/1	.494	.499	.500	.498	.500	.497	.497	.501	.503	.838	1									
G1/3	.487	.492	.493	.491	.493	.490	.490	.494	.496	.936	.856	1								
Artasa	.479	.484	.485	.483	.485	.485	.485	.486	.485	.836	.913	.859	1							
D.Juan	.379	.383	.382	.380	.382	.382	.382	.383	.379	.466	.463	.474	.485	1						
G1/3b	.378	.382	.381	.379	.381	.380	.380	.382	.378	.465	.465	.470	.477	.989	1					
G16183	.415	.419	.417	.416	.417	.417	.417	.418	.415	.543	.553	.546	.550	.577	.583	1				
G14/14a	.413	.417	.416	.414	.416	.416	.416	.417	.413	.551	.568	.557	.568	.586	.592	.892	1			
G16/12l	.406	.411	.409	.407	.409	.409	.409	.410	.406	.538	.565	.558	.565	.556	.562	.873	.909	1		
G16186	.408	.412	.410	.408	.410	.410	.410	.411	.408	.538	.548	.543	.544	.578	.584	.968	.892	.869	1	
G10/3	.407	.411	.410	.408	.410	.409	.409	.410	.407	.537	.546	.542	.543	.577	.583	.960	.895	.87	.99	1

Figura 4.4.5: Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Nei y Li a las 20 entradas, utilizando caracteres RAPDs.

	G14/4	D.Guiem	G6/2	G14	G2/1	G10/13l	G6/19	D.Arm.	G6	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan	G1/3b	G16183/14	G14/14a	G16/12l	G16186/16	G10/3	
G14/4	1																				
D.Guiem	.994	1																			
G6/2	.992	.997	1																		
G14	.996	.996	.996	1																	
G2/1	.992	.997	1	.996	1																
G10/13l	.993	.999	.996	.994	.996	1															
G6/19	.993	.999	.996	.994	.996	1	1														
D.Arm.	.993	.999	.999	.997	.999	.997	.997	1													
G6	.989	.994	.994	.993	.994	.996	.996	.996	1												
G1	.664	.669	.669	.668	.669	.667	.667	.670	.672	1											
G6/1	.661	.666	.667	.665	.667	.664	.664	.668	.669	.912	1										
G1/3	.655	.659	.660	.658	.660	.657	.657	.661	.663	.967	.923	1									
Artasa	.647	.652	.653	.651	.653	.653	.653	.654	.653	.911	.955	.924	1								
D.Juan	.550	.554	.553	.551	.553	.552	.552	.554	.550	.636	.633	.643	.653	1							
G1/3b	.549	.553	.552	.550	.552	.551	.551	.552	.549	.635	.635	.640	.646	.994	1						
G16183	.586	.591	.589	.587	.589	.589	.589	.590	.586	.704	.712	.706	.709	.732	.737	1					
G14/14a	.585	.589	.587	.585	.587	.587	.587	.588	.585	.710	.724	.715	.724	.739	.744	.943	1				
G16/12l	.578	.582	.581	.579	.581	.580	.580	.582	.578	.700	.722	.716	.722	.714	.719	.932	.953	1			
G16186	.579	.584	.582	.580	.582	.582	.582	.583	.579	.699	.708	.704	.705	.733	.738	.984	.943	.93	1		
G10/3	.578	.583	.581	.579	.581	.581	.581	.582	.578	.698	.707	.703	.704	.732	.737	.980	.945	.93	.99	1	

Para determinar el grado de correspondencia entre los valores de similitud estimados con uno u otro de los coeficientes de asociación, las matrices generadas fueron comparadas entre sí por el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson. Éste determinó que ambas matrices están altamente correlacionadas ($r = 0,997$).

Particularmente el análisis estadístico de los perfiles de marcadores de proteínas y de ADN pertenecientes a distintos materiales, consiste usualmente en tres pasos: el primero de ellos corresponde a la clasificación de los perfiles, el segundo al cálculo de las distancias genéticas entre los materiales y el tercero al resumen de las relaciones genéticas como por ejemplo un fenograma (Piepho y Laidig, 1997).

Como se puede observar en las figuras 4.4.4 y 4.4.5 las matrices de similitud expresan la asociación entre pares de genotipos, siendo esta información insuficiente para expresar las relaciones entre la totalidad de las entradas. Existe una gran cantidad de técnicas que sintetizan la información contenida en la matriz de similitud, permitiendo establecer las relaciones entre el total de las entradas. Estas técnicas llamadas de agrupamiento, permiten formar grupos de entradas que se ensamblan de acuerdo al valor de asociación obtenido en la matriz de similitud propiamente dicha.

Las técnicas de agrupamientos más usadas son llamadas del "grupo par" (Crisci y Lopez Armengol, 1983), en las cuales en cada etapa de agrupamiento se establece una nueva asociación entre dos miembros, incorporando una nueva entrada a un núcleo o grupo, o grupo de entradas a un grupo ya formado en una etapa anterior. Un núcleo está integrado por dos entradas y un grupo es un conjunto de más de dos entradas. Todas estas técnicas examinan la matriz de similitud y luego de descartar la diagonal principal, que corresponde a la comparación de cada entrada consigo misma, identifican a las entradas que comparten el máximo coeficiente de similitud agrupándolas en un núcleo. Luego de este primer paso que es común a todas las técnicas de agrupamiento del "grupo par", en este trabajo se eligió la técnica de ligamiento promedio no ponderado. Esta técnica considera que en los pasos siguientes el candidato a incorporarse toma un valor de similitud promedio resultante de su propio valor de similitud y el de los integrantes del núcleo o grupo anterior. La más utilizada es la media aritmética no ponderada (UPGMA, unweighted pair-group method using arithmetic averages).

A partir del primer paso de agrupamiento se genera una matriz derivada, esta matriz se diferencia de la matriz de similitud propiamente dicha, porque las dos entradas que formaron un núcleo por compartir el mayor coeficiente de similitud son consideradas como una unidad en el siguiente paso, con respecto al resto de las entradas. Es así que, al comparar la matriz de similitud y la derivada esta presenta una fila y columna menos. A continuación se generarán

paso a paso nuevas matrices derivadas de menor tamaño hasta que finalmente todos los núcleos o grupos de entradas sean contenidos en uno solo.

La representación gráfica de los agrupamientos obtenidos se realizó mediante una estructura arborescente o también llamado fenograma (figuras 4.4.6 y 4.4.7). Debajo de cada gráfico se muestra una escala (0 - 1) con rangos de valores intermedios, para facilitar el cálculo de los valores de asociación. La proyección a la escala de los ejes verticales del árbol expresa el valor de asociación entre los distintos núcleos o grupos de entradas. El gráfico permite resumir en una imagen bidimensional a los distintos agrupamientos logrados en cada una de las matrices derivadas.

Figura 4.4.6: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y el coeficiente de Jaccard.

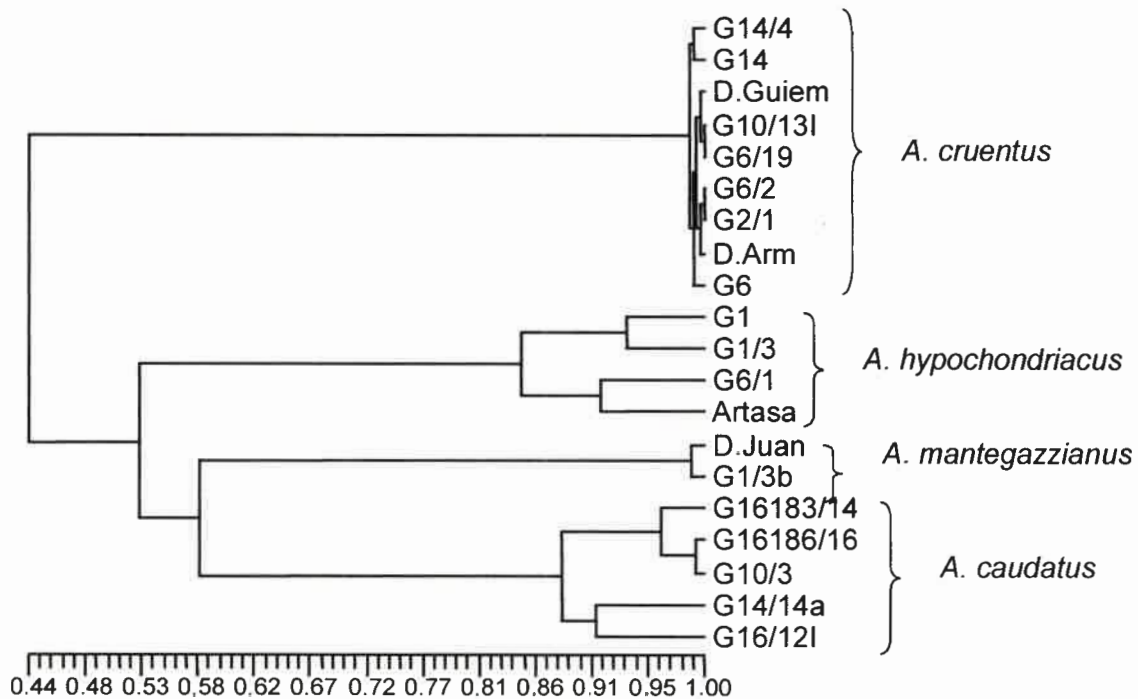
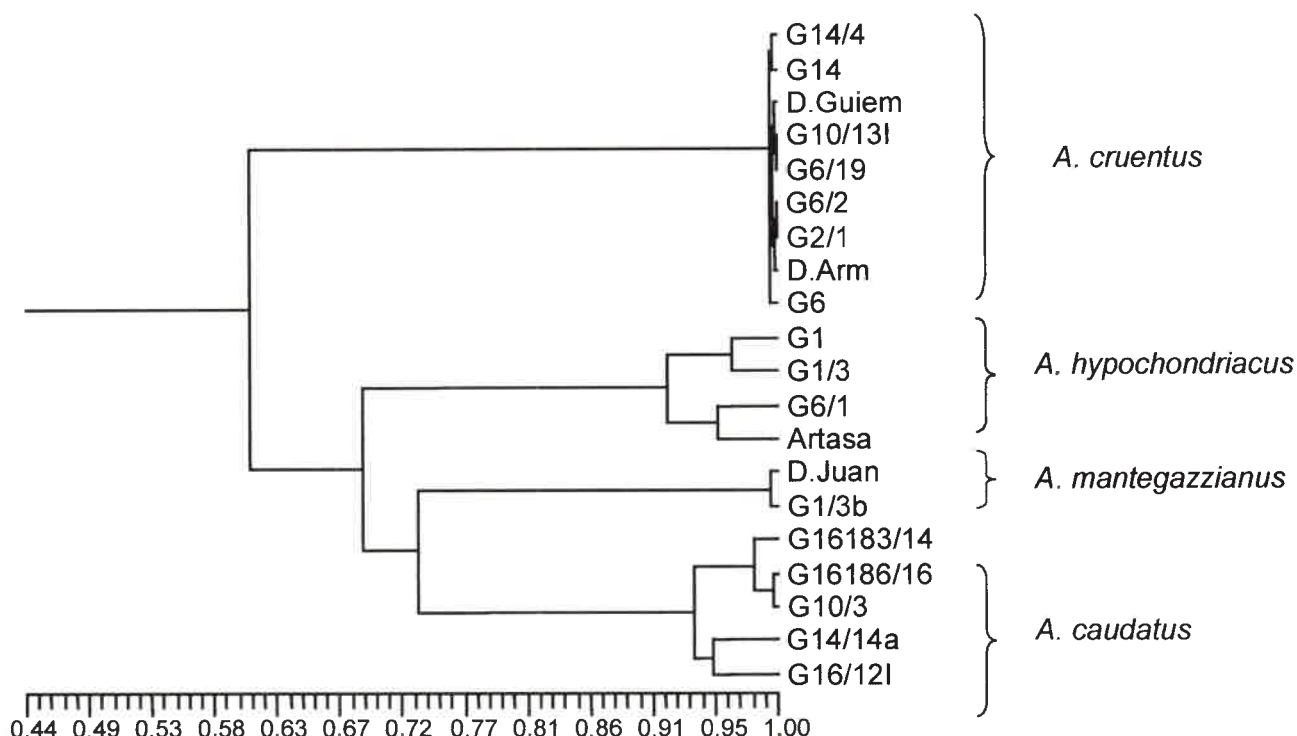


Figura 4.4.7: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y el coeficiente de Nei & Li.



El coeficiente de correlación cofenético (c.c.c.) fue calculado para cada fenograma. Este coeficiente establece el grado de distorsión con el que un fenograma, matriz vector, representa a las distancias genéticas contenidas en la matriz de similitud propiamente dicha. Esta distorsión surge al realizar con las relaciones de asociación de la matriz de similitud una representación gráfica bidimensional. Para ello, primero se transforma a la matriz vector (fenograma) en una nueva matriz de similitud llamada matriz cofenética, la cual es simétrica a la matriz de similitud propiamente dicha. Luego con el coeficiente de correlación producto-momento de Pearson se compara la matriz de similitud y la matriz cofenética. El valor de c.c.c. = 0,988 fue para la matriz de similitud lograda con el índice de Jaccard y la matriz cofenética que representa al fenograma de la figura 4.4.6 y el c.c.c. = 0,978 fue obtenido para la matriz de similitud calculada con el índice de Nei & Li y la matriz cofenética del fenograma de la figura 4.4.7, respectivamente. También se estimó la correlación entre las matrices cofenéticas derivadas de ambos fenogramas. Al igual que lo ocurrido con las

matrices de similitud de ambos coeficientes de asociación, los fenogramas estuvieron también altamente correlacionados ($r = 0,998$).

El coeficiente de correlación cofenético es una medida de distorsión interna de la técnica. Se ha demostrado empíricamente que los valores superiores a 0,8 indican una buena representación de la matriz de similitud por el fenograma y, en general, que los fenogramas obtenidos por la técnica UPGMA presentan la menor distorsión porque establecen los agrupamientos en función del promedio de los coeficientes de similitud alcanzado por las entradas que integran al grupo (Crisci y Lopez Armengol, 1983). Los valores de c.c.c. generalmente oscilan entre 0,6 y 0,95, por lo que los coeficientes de correlación obtenidos entre cada fenograma y la respectiva matriz de similitud indican un muy buen ajuste del gráfico respecto a los coeficientes de asociación originales.

Para la elaboración del fenograma, el programa NTSYS permite trabajar con la opción FIND. Esta opción otorga la posibilidad de que con los valores contenidos en una matriz de similitud obtener hasta 25 gráficos diferentes. Esto es debido a las diferentes posibilidades con que se pueden aglomerar las entradas, especialmente cuando muchas comparten valores de asociación similares. En el caso de obtener varios agrupamientos o gráficos para un mismo conjunto de entradas, se elige aquel fenograma que obtenga el mayor valor de c.c.c ya que representaría la menor distorsión. En este caso en particular al trabajar con la opción FIND sólo se obtuvo un árbol resultante para cada una de las matrices de similitud.

En las dos estructuras arborescentes (Figs. 4.4.6 y 4.4.7) se puede observar que la mayor similitud se estableció entre los genotipos de la especie *A. cruentus* (0,98-1). Los genotipos de *A. hypochondriacus* presentaron un rango de asociación entre 0,84 y 0,96, en *A. mantegazzianus* los dos genotipos analizados obtuvieron un valor de similitud genética de 0,99. Finalmente en *A. caudatus* los genotipos alcanzaron un rango de similitud entre 0,87 y 0,99. Las asociaciones establecidas entre estas 20 entradas de amarantos, están direc-

tamente relacionadas con los porcentajes de productos monomórficos intraespecie, hallados previamente. Particularmente en *A. hypochondriacus* y en *A. caudatus* los valores de fragmentos monomórficos fueron los menores, alrededor del 80%. Esto se refleja en ambos dendrogramas al observar que las entradas que corresponden a cada una de estas dos especies comparten una menor similitud genética, comparadas con las líneas de las especies *A. cruentus* y *A. mantegazzianus* aunque en esta última sólo se consideraron dos entradas.

4.5 - Fingerprinting con marcadores RAPDs:

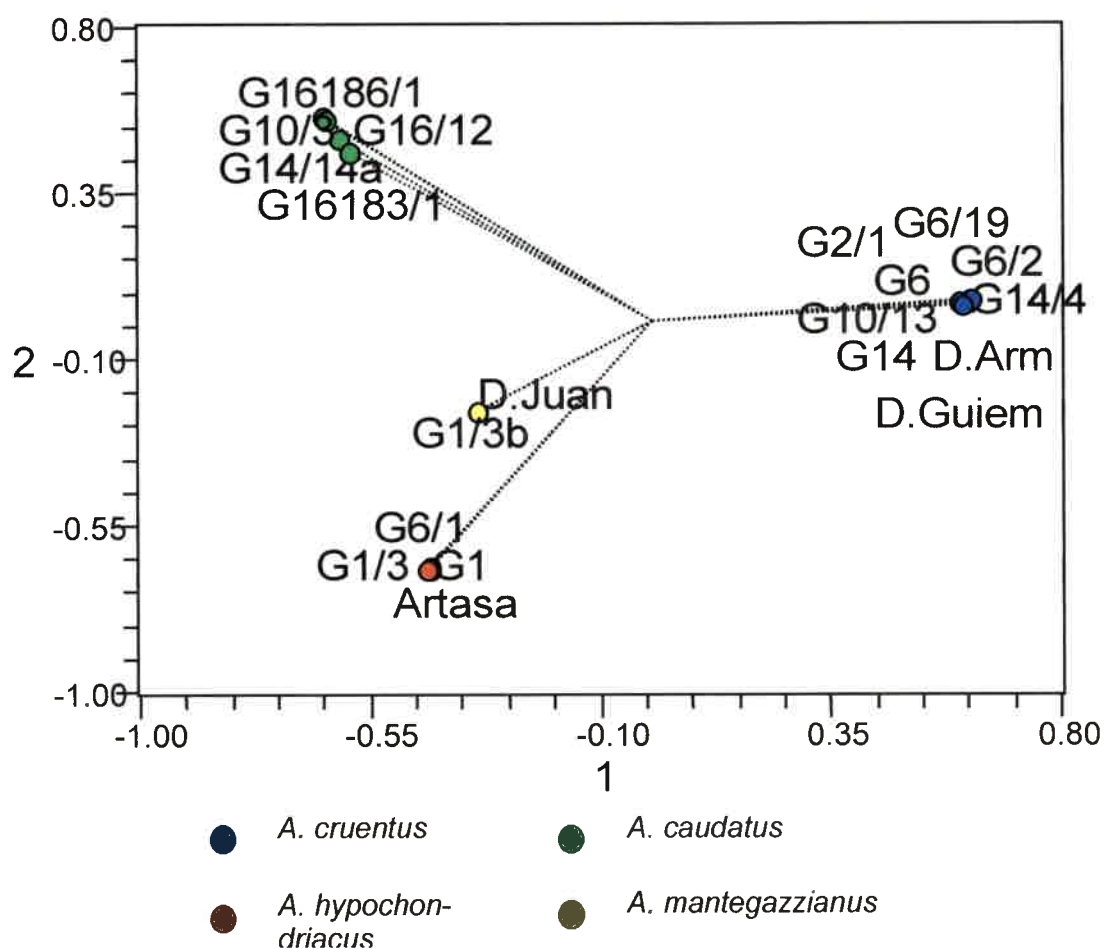
De los 687 loci observados 98 sólo estuvieron presentes en los materiales de *A. cruentus*, 83 en los genotipos de la especie *A. hypochondriacus*, por otra parte en *A. mantegazzianus* fueron 57; y 64 los marcadores que sólo compartieron las líneas experimentales de *A. caudatus*.

En el análisis previo se utilizó el total de marcadores de RAPDs logrados en estos materiales para establecer la similitud genética entre ellos. Ahora los 302 marcadores especie-específicos se emplearon para corroborar el agrupamiento de los genotipos, en función de la especie de amaranto granífero a la cual pertenecen, con el realizado previamente por caracteres morfológicos (ver 3.1). Los loci especie-específicos corresponden al 43,9% del total de los caracteres desarrollados por la técnica de RAPD. Para la selección de estos loci se consideró la presencia del carácter en al menos una de las entradas de cada especie con ausencia del carácter en las entradas de las restantes especies.

Se construyó una matriz básica de datos de 302 caracteres para calcular mediante el coeficiente de asociación de Jaccard la matriz de similitud entre genotipos. Luego, esta segunda matriz fue doblemente centrada para realizar el análisis de ordenamiento de coordenadas principales con el programa

NTSYS-pc 2.0. Este método de ordenamiento, empleado para variables cualitativas, centra a los genotipos en una nube de puntos más o menos concéntrica preservando las relaciones de similitud establecidas entre ellos. La figura 4.5.1 corresponde a la representación bidimensional del ordenamiento de las entradas en función de un centro.

Figura 4.5.1: Ordenamiento de las entradas en función de los marcadores especie-específicos.



El agrupamiento de las entradas, según se observa en la figura 4.5.1, permite demostrar que la cantidad de *fingerprintings* únicos para cada especie determinada por la técnica de RAPD, estableció grupos claramente definidos con estas 20 entradas y que estos grupos a su vez, se corresponden con las especies a las que fueron designados previamente estos materiales con ca-

racteres morfológicos. Estos resultados demuestran la utilidad de estos marcadores moleculares para ser empleados como complemento de la información morfológica para la identificación y descripción de materiales de amarantos. El análisis de coordenadas principales preserva las distancias desde el origen porque sitúa a las entradas en un espacio factorial reducido, preservando entre ellas las relaciones de similitud, descritas previamente en este caso por una medida de asociación. Por lo que este gráfico es la mejor expresión posible de las asociaciones de estas entradas en un espacio reducido.

En el cuadro 4.5.1 se detalla el número de marcadores RAPDs de presencia única determinados a nivel intra-específico, los que podrán emplearse como patrones de *fingerprintings* de las líneas experimentales o cultivares.

Cuadro 4.5.1: RAPDs entrada-específicos que identifican a algunas de las 20 entradas de amaranto.

Entrada	Marcador RAPD
G14/4 (L)	OPA03(1); OPA03(2)
Don Guiem (cv)	----
G6/2 (L)	----
G14 (L)	----
G2/1 (L)	----
G10/13l (L)	----
G6/19 (L)	----
Don Armando (cv)	----
G6 (L)	----
G1 (L)	OPA12(6); OPD20(16); OPA9(8); OPD10(7); OPA1(11)
G6/1 (L)	OPA08(10); OPA08(11); OPA18(16); OPA10(15)
G1/3 (L)	OPA15(7); OPC14(13); OPD12(4); OPD10(17)
Artasa (cv)	OPA12(9); OPA1(13); OPD10(12)
Don Juan (cv)	----
G1/3b (L)	----
G16183/14 (L)	OPD20(25)
G14/14a (L)	OPA08(17)
G16/12l (L)	OPC02(9); OPC15(5); OPC14(25); OPC14(26)
G16186/16 (L)	----
G10/3 (L)	OPD08(14)

() Número otorgado a la banda según su posición relativa en el gel desde el ánodo. ---- Ausencia de un marcador entrada-específico.

Todos los marcadores específicos de RAPDs hallados en estas 20 entradas corresponden a la presencia de un fragmento amplificado en un genotipo y a la ausencia del mismo en los 19 restantes. Como se puede apreciar en el cuadro 4.5.1 no todas las entradas presentaron marcadores específicos entre los 687 caracteres RAPDs. De los cuatro cultivares analizados, sólo Artasa presentó tres marcadores cultivar-específicos y entre las líneas experimentales, ocho fueron identificadas con polimorfismos únicos. El desarrollo de marcadores genéticos cultivar-específicos es importante en la identificación de los cultivares, en la protección de la propiedad de los mejoradores y para la determinación de la pureza varietal (Yang y Quiros, 1993).

Cuadro 4.5.2: *Fingerprintings* establecidos con 16 marcadores RAPDs para las 20 entradas analizadas.

Marcador	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>				<i>A. mante-</i>	<i>A. caudatus</i>											
	G14/4	D.Guitem	G6/2	G14	G2/1	G10/13I	G6/19	D.Arm.	G6	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan	G1/3b	G16183	G14/14a	G16/12I	G16186	G10/3	
OPC20/6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD15/13	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA03/1	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB20/4	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPB20/7	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPB13/4	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OPA15/7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA8/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA12/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
OPA12/9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
OPD10/18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
OPC20/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
OPD15/11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
OPC15/5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
OPD8/14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
OPB15/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+

(+) Presencia del fragmento amplificado, (-) Ausencia.

En el cuadro 4.5.2 se establecieron patrones de *fingerprintings* que identifican a las distintas entradas de amarantos. Con el empleo de 16 marcadores RAPDs de diferente nivel de especificidad se pudieron establecer patrones únicos para 16 entradas. Las líneas experimentales G10/13I y G6/19 no se pudieron diferenciar entre sí, como tampoco lo hicieron las líneas G6/2 y G2/1, por alguna combinación de estos marcadores genéticos.

Con el fin de estimar la capacidad de los diferentes iniciadores de RAPDs para detectar variabilidad genética en las entradas de amaranto analizadas, se calcularon los PICs para cada uno de ellos (Cuadro 4.5.3).

Cuadro 4.5.3: Índices de contenido polimórfico promedio para los iniciadores RAPDs.

Oligo	PIC	Oligo	PIC	Oligo	PIC	Oligo	PIC
OPA01	0,306	OPA20	0,143	OPC02	0,159	OPD01	0,30
OPA03	0,285	OPB05	0,324	OPC04	0,316	OPD05	0
OPA04	0,169	OPB06	0,248	OPC05	0,222	OPD07	0,132
OPA05	0	OPB10	0,316	OPC06	0	OPD08	0,339
OPA08	0,341	OPB12	0,29	OPC08	0,34	OPD10	0,354
OPA09	0,374	OPB13	0,311	OPC10	0,272	OPD12	0,114
OPA10	0,364	OPB14	0,201	OPC12	0,305	OPD13	0,216
OPA12	0,158	OPB15	0,249	OPC13	0,422	OPD14	0,036
OPA13	0,214	OPB17	0,362	OPC14	0,244	OPD15	0,252
OPA14	0,308	OPB18	0,384	OPC15	0,154	OPD18	0,251
OPA15	0,354	OPB19	0,324	OPC18	0,284	OPD20	0,215
OPA18	0,274	OPB20	0,247	OPC19	0		
OPA19	0,204	OPC01	0,37	OPC20	0,30		

Para comparar el grado de polimorfismo de los iniciadores RAPDs con respecto al número de bandas totales, se realizó un promedio de los PICs agrupando los iniciadores que otorgaron un número de bandas ≤ 5 , ≤ 10 , ≤ 15 , ≤ 20 , ≤ 25 y ≤ 30 (Cuadro 4.5.4).

Cuadro 4.5.4: Índices de contenido polimórfico promedio para grupos de iniciadores RAPDs de acuerdo al número de bandas totales.

Nº de bandas totales	PIC
≤5	0,0727 (0,0689)
≤10	0,2331 (0,1345)
≤15	0,2722 (0,078)
≤20	0,2987 (0,052)
≤25	0,289 (0,073)
≤30	0,244 (0,03)

(Desvío estándar).

Los índices de polimorfismo promedio ascendieron desde los iniciadores que otorgaron 5 bandas totales hasta aquellos con 20. De acuerdo a estos resultados se puede considerar que los iniciadores más informativos para detectar variabilidad en estas entradas de amaranto fueron aquellos que otorgaron un número de bandas totales superior a 10.

4.6 - Reacción de amplificación de AFLPs:

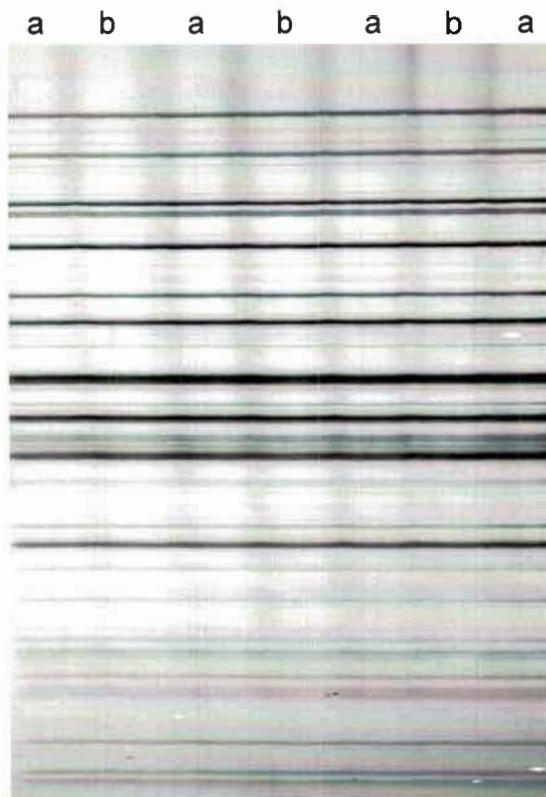
La puesta a punto de la reacción de AFLP se realizó directamente con la mezcla de ADN de las cinco plantas individuales para cada entrada. Los ADNs extraídos de estas plantas habían sido previamente evaluados en calidad en las reacciones de RAPDs.

En este caso se siguió el protocolo descrito por Vos *et al.* (1995) con mínimas modificaciones.

Primero, a partir de la reacción de ligación se realizaron dos reacciones de PCR +1 de manera independiente, empleando un par de iniciadores y dos

entradas de amaranto. Los patrones de bandas observados en el gel de poliacrilamida fueron idénticos (figura 4.6.1). Posteriormente, se realizó un experimento factorial en la PCR +3 contemplando distintas diluciones de la PCR +1 y distintas concentraciones de la enzima *Taq* ADN polimerasa. Se emplearon 0,5, 1, 2, 3, y 4 μ l de una dilución 1:10 de la PCR +1 (pre-amplificación) y 0,2, 0,3 y 0,4 μ l de la enzima ADN polimerasa (5 U/ μ l). Se logró en todas las combinaciones probadas de enzima y PCR +1, con un par de iniciadores y un ADN, el mismo patrón de bandas, lo cual demuestra la reproducibilidad de la técnica y brinda la seguridad de obtener patrones de bandas confiables, para concentraciones de PCR +1 que varían en un factor de 3,5 manteniendo estas condiciones de trabajo.

Figura 4.6.1: Patrones de AFLP de dos reacciones de PCR +1 independientes.



a y b corresponden a amplificaciones obtenidas de cada PCR+1.

4.7 - Variación inter-poblacional de los marcadores AFLPs:

La estimación de las distancias genéticas entre las 20 entradas también se realizó empleando los marcadores AFLPs. Con la finalidad de comparar la sensibilidad de ambas técnicas para caracterizar a estos materiales de amaranto, se decidió utilizar un número de marcadores similares de RAPDs y AFLPs.

Los marcadores AFLPs se separan en geles de poliacrilamida en condiciones tales que la electroforesis de las dos cadenas de ADN para cada fragmento amplificado migren separadas, mientras que los marcadores RAPDs se identifican en geles de agarosa en donde las dos cadenas de ADN pertenecientes a la misma banda migran juntas. Sin embargo, cuando son elevados los niveles de heterocigosis y complejos los patrones de AFLPs la asignación de los alelos a un locus, puede ser dificultosa sin el conocimiento del pedigrí (Karp y Edwards, 1995). Como se desconoce la secuencia de los fragmentos de AFLP amplificados, no se puede determinar a priori si dos bandas de peso molecular muy parecido corresponden a las dos cadenas de ADN complementarias de un mismo locus o, si corresponden a dos loci diferentes. Debido a esto se decidió utilizar en AFLPs el doble de caracteres que los obtenidos en RAPDs para comparar la información resultante por estos dos tipos de marcadores. De esta manera se obtuvieron para este análisis 1394 bandas AFLPs. Las combinaciones de iniciadores *EcoR* I y *Mse* I con la secuencia de nucleótidos y el número de marcadores obtenidos por cada par se detallan en el cuadro 4.7.1.

Cuadro 4.7.1: Código, secuencia y número de bandas obtenidas con los pares de iniciadores *EcoR* I y *Mse* I.

Oligo <i>EcoR</i> I¹	Oligo <i>Mse</i> I¹	Nº de bandas
38 5' GACTGCGTACCAATTCACT	37 5' GATGAGTCCTGAGTAAACG	59 (37)
	38 5' GATGAGTCCTGAGTAAACT	99 (48)
	39 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA	42 (23)
	40 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGC	-----
	41 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGG	-----
	42 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT	45 (25)
	43 5' GATGAGTCCTGAGTAAATA	57 (32)
	44 5' GATGAGTCCTGAGTAAATC	85 (62)
	45 5' GATGAGTCCTGAGTAAATG	73 (47)
	46 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT	216 (167)
41 5'GACTGCGTACCAATTCAGG	35 5' GATGAGTCCTGAGTAAACA	41 (20)
	37 5' GATGAGTCCTGAGTAAACG	41 (27)
	38 5' GATGAGTCCTGAGTAAACT	33 (27)
	39 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA	-----
	40 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGC	28 (12)
	41 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGG	26 (11)
	42 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT	36 (25)
	43 5' GATGAGTCCTGAGTAAATA	60 (41)
	44 5' GATGAGTCCTGAGTAAATC	32 (14)
	45 5' GATGAGTCCTGAGTAAATG	47 (35)
46 5' GATGAGTCCTGAGTAAATT	76 (39)	
42 5'GACTGCGTACCAATTCAGT	40 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGC	76 (58)
	41 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGG	65 (36)
	42 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT	75 (43)
	43 5' GATGAGTCCTGAGTAAATA	82 (54)

¹Vos *et al.* (1995), () Número de fragmentos polimórficos por cada par de iniciadores.

Tres pares de iniciadores lograron un número pequeño de bandas (≤ 10) para marcadores AFLPs, por lo que se descartaron del análisis. Por lo tanto, con 22 iniciadores se obtuvo la cantidad deseada de marcadores moleculares, con un promedio de 63,4 bandas. En el cuadro 4.7.1, entre paréntesis, se enumeran las bandas que fueron polimórficas, en al menos una entrada, por cada par de iniciadores. El porcentaje promedio de fragmentos polimórficos por iniciador, logrados por esta técnica corresponde al 61,2%.

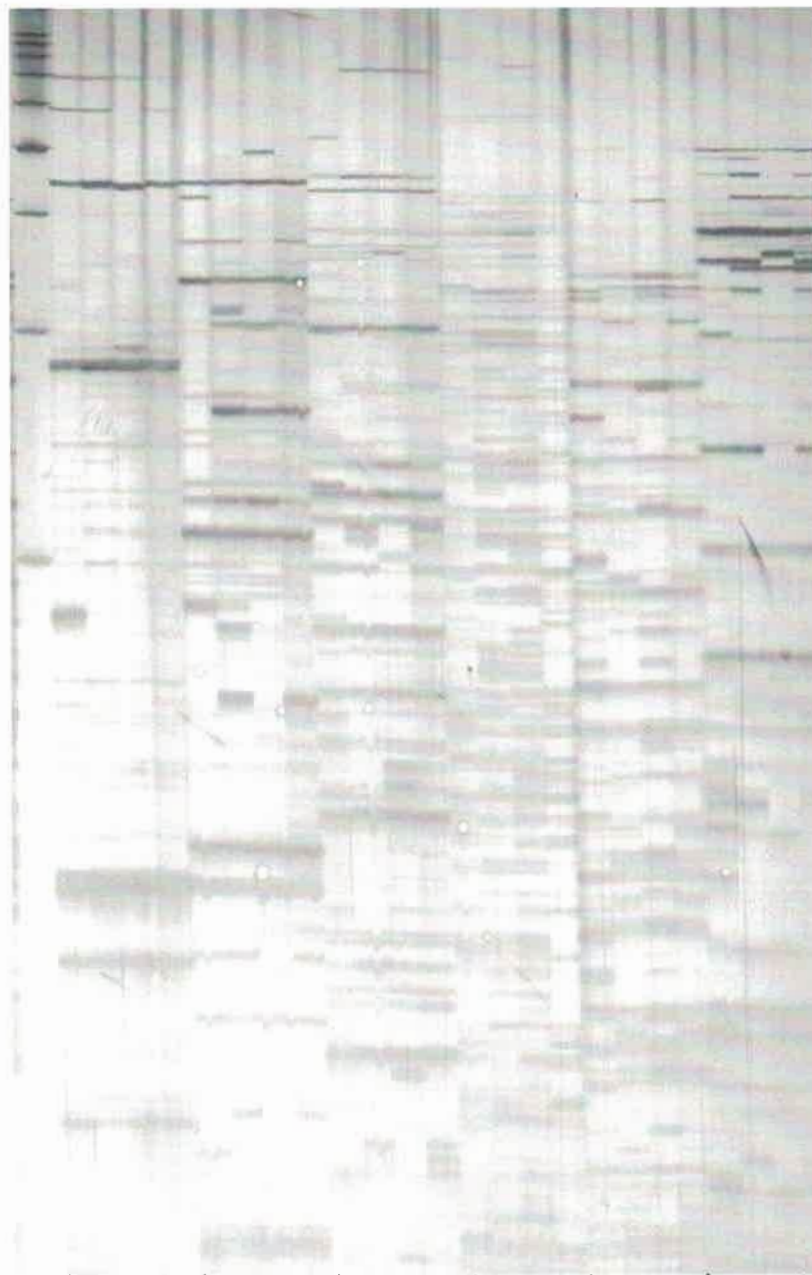
En el anexo 4.7.1 se encuentra la matriz básica de marcadores de AFLPs. La misma contiene en sus columnas las 20 entradas y en las filas se encuentran los caracteres, definidos en función del par de iniciadores *EcoR I* y *Mse I* y el número de banda en el gel. Como se observa en la matriz básica un total de 897 fragmentos fueron polimórficos en al menos una de las entradas, los que suman el 64,3% de los marcadores AFLPs.

Los genotipos evaluados de *A. hypochondriacus* y *A. caudatus*, con estos caracteres, son genéticamente los más similares con un 60,76% de productos con igual peso molecular. El resto de comparaciones entre pares de especies otorgó una similitud genética en un rango de 40 a 55%. Finalmente, el 68,86% de los AFLPs correspondieron a marcadores compartidos por más de dos especies.

Al igual que lo observado con RAPDs, con diferentes grupos de iniciadores fue posible determinar fragmentos únicos a nivel inter-específico (Fig. 4.7.1), siendo menor el polimorfismo intra-específico (Fig. 4.7.2). El porcentaje de productos monomórficos estimado dentro de: *A. cruentus* fue 92,78%, en *A. hypochondriacus* 82,29%, en *A. mantegazzianus* fue de 96,28% y en *A. caudatus* 83,80%.

Figura 4.7.1: Patrones de AFLPs obtenidos con distintos iniciadores en una entrada de cada especie.

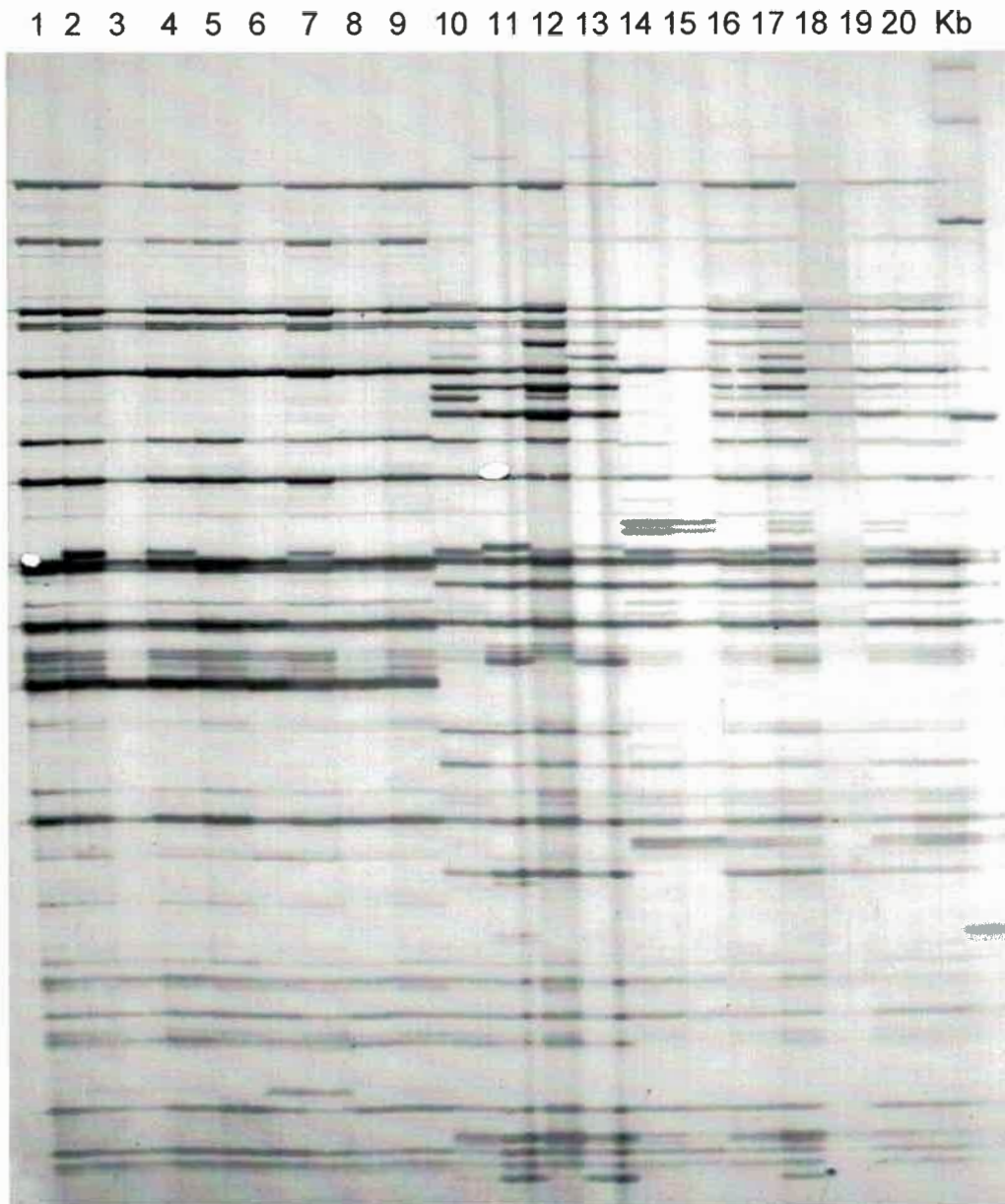
Kb 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4



Iniciadores: E38M37 E42M41 E42M42 E38M46 E42M43 E42M40

1 Entrada de *A. cruentus*, 2 Entrada de *A. hypochondriacus*,
 3 Entrada de *A. caudatus*, 4 Entrada de *A. mantegazzianus*.

Figura 4.7.2: Patrones de AFLPs logrados con la combinación de los iniciadores *EcoR* I 41 y *Mse* I 43 en las 20 entradas de amaranto.



A. cruentus
 1 Don Guiem
 2 Don Armando
 3 G10/13l
 4 G14
 5 G14/4
 6 G6
 7 G2/1
 8 G6/19
 9 G6/2

A. mantegazzianus
 14 G1/3b
 15 Don Juan
A. caudatus
 16 G16/12l
 17 G16183/14
 18 G14/14^a
 19 G16186/16
 20 G10/3

A. hypochondriacus
 10 G1
 11 G1/3
 12 Artasa
 13 G6/1
 Kb: Marcador de
 Peso Molecular

Las relaciones genéticas con caracteres de AFLPs se calcularon de la misma manera que para RAPDs. Las figuras 4.7.3 y 4.7.4 corresponden a las matrices de similitud estimadas con el índice de Jaccard y Nei y Li respectivamente.

Figura 4.7.3: Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Jaccard a las 20 entradas, utilizando caracteres AFLPs.

	G10/3	G16186/16	G16/12I	G14/14a	G16183/14	G1/3b	D.Juan	Artasa	G1/3	G6/1	G1	G6	D.Arm.	G6/19	G10/13I	G2/1	G14	G6/2	D.Guiem	G14/4		
G14/4																					1	
D.Guiem																						.984
G6/2																						.962
G14																						.969
G2/1																						.980
G10/13I																						.984
G6/19																						.979
D.Arm.																						.986
G6																						.969
G1																						.973
G6/1																						.979
G1/3																						.987
Artasa																						.954
D.Juan																						.960
G1/3b																						.964
G16183																						.959
G14/14a																						.971
G16/12I																						.983
G16186																						.970
G10/3																						.979
																						.980
																						.975
																						.987
																						.957
																						.979
																						.974
																						.974
																						.967
																						.976
																						.980
																						.532
																						.532
																						.526
																						.528
																						.528
																						.525
																						.528
																						.530
																						.535
																						.538
																						.540
																						.541
																						.541
																						.538
																						.541
																						.538
																						.544
																						.544
																						.552
																						.551
																						.544
																						.549
																						.547
																						.549
																						.547
																						.548
																						.553
																						.911
																						.873
																						.552
																						.551
																						.544
																						.549
																						.547
																						.549
																						.547
																						.548
																						.553
																						.911
																						.873
																						.554
																						.556
																						.551
																						.552
																						.554
																						.552
																						.552
																						.556
																						.558
																						.868
																						.901
																						.886
																						.529
																						.531
																						.523
																						.526
																						.529
																						.525
																						.526
																						.528
																						.529
																						.642
																						.650
																						.662
				</																		

Figura 4.7.4: Matriz de similitud, obtenida tras la aplicación del coeficiente de asociación de Nei y Li a las 20 entradas, utilizando caracteres AFLPs.

	G14/4	D.Guiem	G6/2	G14	G2/1	G10/13l	G6/19	D.Arm.	G6	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan	G1/3b	G16183/14	G14/14a	G16/12l	G16186/16	G10/3	
G14/4	1																				
D.Guiem	.992	1																			
G6/2	.981	.984	1																		
G14	.984	.990	.992	1																	
G2/1	.989	.993	.984	.986	1																
G10/13l	.980	.976	.979	.982	.979	1															
G6/19	.985	.991	.985	.989	.990	.980	1														
D.Arm.	.991	.995	.982	.987	.994	.978	.989	1													
G6	.987	.987	.983	.988	.988	.980	.988	.990	1												
G1	.695	.694	.690	.691	.691	.689	.691	.693	.697	1											
G6/1	.700	.702	.702	.702	.700	.702	.698	.701	.703	.917	1										
G1/3	.711	.711	.705	.709	.707	.709	.707	.708	.712	.954	.932	1									
Artasa	.713	.715	.710	.712	.713	.712	.712	.715	.716	.929	.948	.940	1								
D.Juan	.692	.694	.687	.689	.692	.688	.689	.691	.692	.782	.788	.797	.793	1							
G1/3b	.687	.689	.689	.689	.687	.688	.684	.686	.687	.777	.790	.788	.786	.981	1						
G16183	.703	.706	.701	.702	.703	.696	.702	.706	.705	.872	.875	.877	.880	.834	.830	1					
G14/14a	.703	.705	.699	.701	.702	.695	.700	.704	.704	.867	.876	.876	.878	.836	.830	.951	1				
G16/12l	.716	.715	.712	.711	.713	.711	.711	.715	.718	.868	.887	.881	.886	.821	.818	.942	.953	1			
G16186	.702	.705	.699	.701	.702	.694	.701	.704	.703	.866	.867	.872	.871	.826	.823	.968	.945	.933	1		
G10/3	.704	.707	.701	.703	.704	.697	.702	.705	.705	.868	.867	.877	.870	.831	.826	.969	.940	.930	.970	1	

Los fenogramas de las figuras 4.7.5 y 4.7.6 representan el agrupamiento de las 20 entradas tras aplicar la técnica UPGMA a ambas matrices de similitud.

Figura 4.7.5: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores AFLPs y el coeficiente de Jaccard.

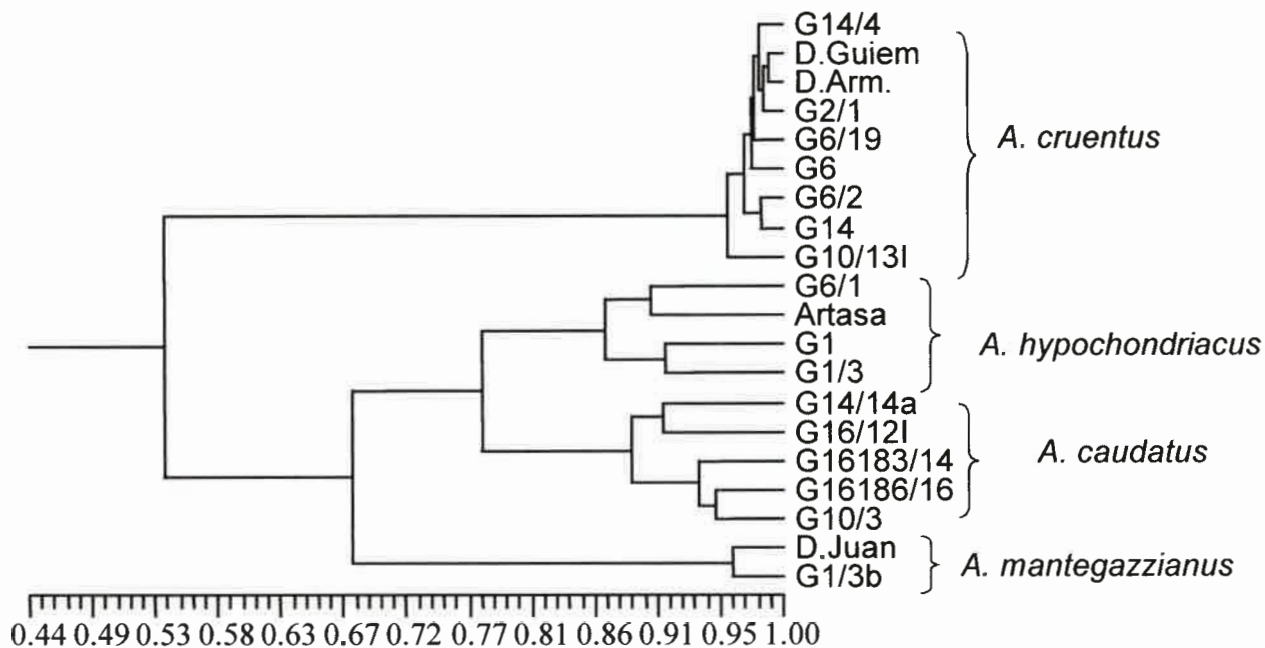
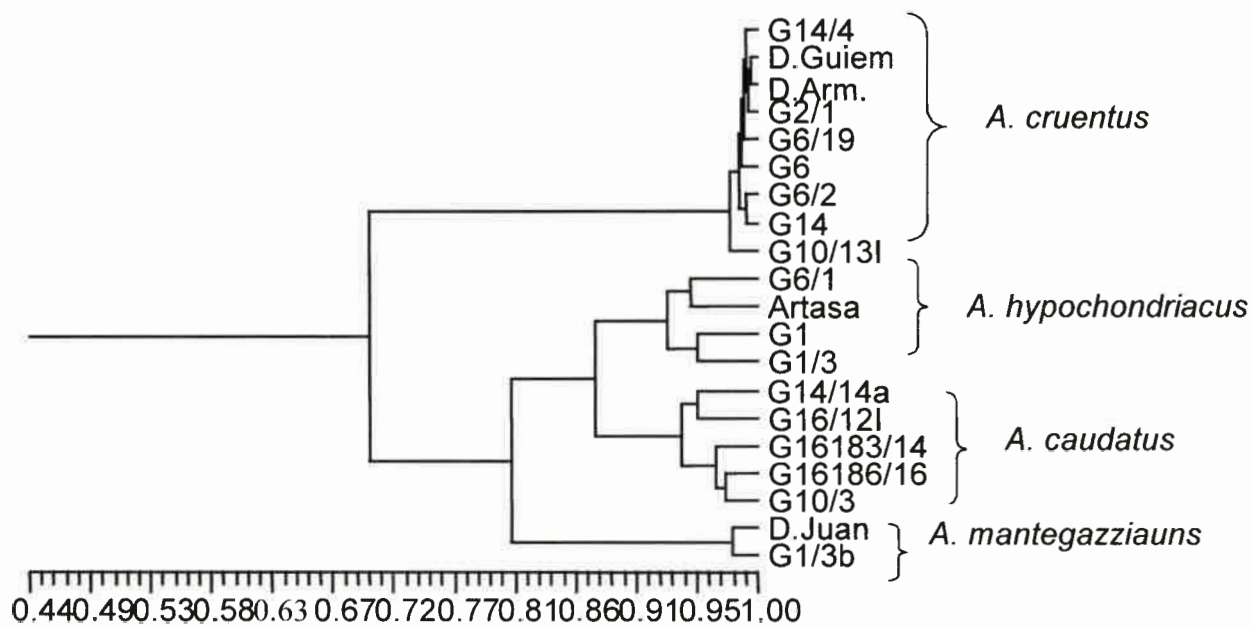


Figura 4.7.6: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores AFLPs y el coeficiente de Nei & Li.



Al igual que en RAPDs la opción FIND del programa NTSYS, otorgó un sólo árbol para graficar las relaciones genéticas entre los materiales.

Posteriormente se transformaron las matrices vectores (fenograma) en sus respectivas matrices cofenéticas. La matriz cofenética del fenograma de la figura 4.7.5 y su respectiva matriz de similitud tomaron un valor de c.c.c. = 0,998. Lo mismo ocurrió para la matriz cofenética del fenograma de la figura 4.7.6 y la matriz de similitud obtenida por el índice de Nei y Li (c.c.c. = 0,997). Las matrices de similitud de los dos índices determinaron un $r = 0,998$. Finalmente la correlación entre ambos fenogramas fue $r = 0,998$, sugiriendo una muy buena correspondencia entre estos fenogramas.

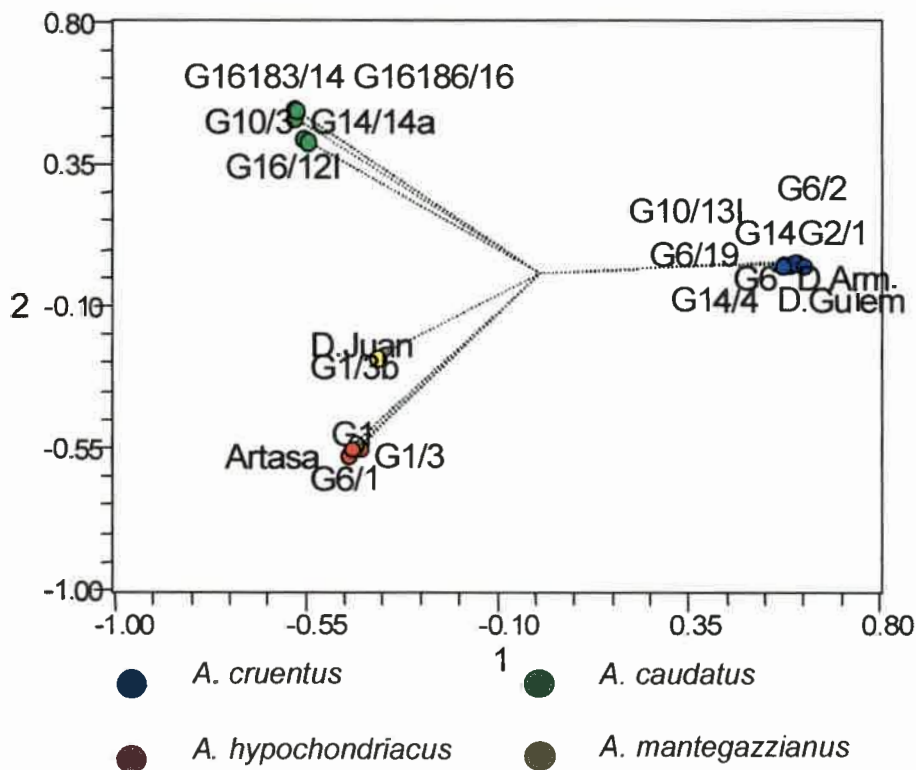
Las similitudes genéticas, establecidas por los marcadores AFLPs entre los genotipos analizados de *A. cruentus* establecieron un rango de 0,96 a 0,99. Un rango de asociación de 0,85 a 0,95 para las entradas de *A. hypochondriacus*, 0,97 fue la similitud de los genotipos de *A. mantegazzianus* y en *A. caudatus* el rango fue de 0,87 a 0,96. Al igual que lo ocurrido anteriormente con marcadores RAPDs (ver 4.4), las asociaciones genéticas entre estas entradas estuvieron directamente relacionadas con el porcentaje de bandas polimórficas halladas para cada especie. Los genotipos pertenecientes a la especie *A. hypochondriacus* y a *A. caudatus*, los que presentaron alrededor de un 20% de loci polimórficos en AFLPs, también son los que presentaron entre sí un rango más variable de asociación.

4.8 - Fingerprinting con marcadores AFLPs:

Con estos marcadores el número de bandas presentes sólo en los genotipos de la especie *A. cruentus* fue 221, 82 marcadores amplificaron sólo en las entradas de *A. hypochondriacus*, 66 para los dos genotipos de *A. mantegazzianus* y finalmente 70 en *A. caudatus*.

Los 439 marcadores especie-específicos se cargaron en una matriz básica para establecer la similitud de las entradas por el coeficiente de Jaccard. Luego, la matriz de similitud fue doblemente centrada para realizar el análisis de ordenamiento de estas entradas, por estos marcadores genéticos, tras la aplicación de la técnica de coordenadas principales (figura 4.8.1).

Figura 4.8.1: Ordenamiento de las entradas en función de los marcadores especie-específicos.



En este gráfico las relaciones entre las entradas se establecen según la posición que ocupan en un espacio reducido, donde a diferencia de la técnica de agrupamiento no se establecen límites por trazos. Aquí cuanto más cerca se disponen las entradas más relacionadas están. Los marcadores especie-específicos de AFLPs al igual que los marcadores RAPDs (ver 4.5) determinaron que las entradas de las especies *A. cruentus*, *A. hypochondriacus* y *A. caudatus* se agruparan de manera definida en cuadrantes diferentes del gráfico de coordenadas principales. Por otra parte las entradas de *A. mantegazzianus* aunque integraron un grupo independiente al resto de las especies en los dos

gráficos no lo hicieron de manera tan definida como el resto de las entradas. Quizá esto se deba a que sólo fueron incluidas dos entradas de esta especie.

En el cuadro 4.8.1 se encuentran los marcadores AFLPs que sólo se presentaron en una de las 20 entradas.

Cuadro 4.8.1: AFLPs entrada-específicos que identifican a algunas de las 20 entradas de amaranto.

Entrada	Marcador AFLP
G14/4 (L)	38-46(34)
Don Guiem (cv)	---
G6/2 (L)	38-46(209); 38-37(21); 41-38(17)
G14 (L)	---
G2/1 (L)	41-40(14); 38-46(137)
G10/13l (L)	38-46(191); 38-37(16); 38-37(18)
G6/19 (L)	38-37(37); 42-41(20)
Don Armando (cv)	41-45(10)
G6 (L)	---
G1 (L)	41-38(23); 41-38(24); 41-42(23); 38-44(66); 38-44(67); 38-44(68); 38-39(6); 38-39(8); 38-46(72); 38-46(73); 38-46(74); 38-46(75); 38-46(109); 38-46(141); 38-46(142); 38-46(143); 38-46(158); 38-46(161); 38-46(167); 38-46(168); 38-46(169); 38-46(216); 42-40(4); 42-40(45); 42-43(18)
G6/1 (L)	41-38(30); 41-35(3); 41-35(4); 41-35(5); 41-45(12); 41-45(14); 41-45(29); 41-43(25); 42-43(79); 38-44(39); 38-44(70); 38-44(71); 38-44(72); 38-44(74); 38-44(75); 38-44(76); 42-41(12); 42-41(13); 38-45(25)
G1/3 (L)	41-45(13); 41-45(33); 41-37(14); 41-38(6); 41-38(14)
Artasa (cv)	41-43(15); 41-37(12); 41-37(20); 38-39(7); 38-46(180)
Don Juan (cv)	38-45(57); 38-45(59); 42-40(6)
G1/3b (L)	41-45(5); 41-37(18); 38-38(1); 38-38(4); 38-46(212); 42-40(31); 42-40(33); 42-40(34); 42-40(35)
G16183/14 (L)	41-42(29); 41-45(8); 38-37(38); 38-37(51); 41-35(23)
G14/14a (L)	41-42(20); 38-39(9); 38-46(100); 38-46(129); 41-38(19); 41-38(20)
G16/12l (L)	41-42(13); 38-43(26); 38-43(53); 38-46(119); 38-46(120)
G16186/16 (L)	41-38(21); 38-46(144); 38-46(145)
G10/3 (L)	41-38(1)

Cada marcador fue denominado por un primer número que corresponde al iniciador *EcoR* I y seguido por un guión el número del iniciador *Mse* I. () Número otorgado a la banda según su posición relativa en el gel desde el ánodo.
--- Ausencia de un marcador entrada-específico.

Los marcadores 38-46(72), 38-46(73), 38-46(109), 38-46(141), 38-46(142), 38-46(161), 38-46(167), 38-46(168), 38-46(169), 42-40(45), 42-43(18) y 38-44(66) específicos de la línea experimental G1 se deben a la ausencia de fragmento amplificado de la misma contra la presencia en las otras 19 entradas. Lo mismo ocurre para la línea experimental G6/1 con los marcadores 38-44(71) y 38-44(75), en la línea G1/3b con los fragmentos 41-45(5) y 41-37(18) y en la línea G16186/16 con las bandas 38-46(144) y 38-46(145). Los restantes 80 marcadores AFLPs específicos a nivel especie, encontrados en el total de 1394 marcadores evaluados, se deben a la amplificación del fragmento en la entrada identificada en el cuadro 4.7.1 y a la ausencia del mismo en el resto.

A diferencia de lo sucedido en RAPDs en donde solo nueve entradas poseían bandas específicas (Cuadro 4.5.1) aquí con el grupo de caracteres de AFLPs se encontraron bandas específicas para 17 de las entradas de amarantos graníferos probadas.

En el cuadro 4.8.2 se emplearon la misma cantidad de marcadores AFLPs que en el cuadro 4.5.2 de caracteres RAPDs. En este caso las 20 entradas fueron identificadas por un patrón único descrito por la combinación de varios loci.

Cuadro 4.8.2: *Fingerprintings* establecidos con 16 marcadores AFLPs para las 20 entradas analizadas.

Marcador	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>				<i>A. mantegazzianus</i>		<i>A. caudatus</i>								
	D.Guilem G14/4	G6/2	G14	G2/1	G6/19	G10/13I	G6	D.Arm.	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan	G1/3b	G16/183/14	G14/14a	G16/12I	G16/186/16	G10/3
41-40/14	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-45/6	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-46/191	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-43/143	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42-41/20	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-46/135	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38-46/126	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-45/10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42-43/38	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-37/20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
41-38/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
41-38/6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-38/23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-38/30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41-38/19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
41-38/21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
41-42/13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
41-42/29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
38-45/57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
38-38/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

Cada marcador fue denominado por un primer número que corresponde al iniciador *EcoR* I y seguido por un guión el número del iniciador *Mse* I. (+) Presencia del fragmento amplificado, (-) Ausencia.

Con el fin de estimar la capacidad de las distintas combinaciones de oligonucleótidos selectivos +3 de AFLPs para detectar variabilidad genética en las entradas de amaranto analizadas, se calcularon los PICs para cada una de ellas (Cuadro 4.8.3).

Cuadro 4.8.3: Índices de contenido polimórfico promedio para las combinaciones de iniciadores AFLPs.

Oligos	PIC	Oligos	PIC
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 37	0,216	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 40	0,172
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 38	0,193	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 41	0,186
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 39	0,205	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 42	0,226
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 42	0,251	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 43	0,269
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 43	0,193	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 44	0,203
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 44	0,229	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 45	0,228
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 45	0,258	<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 46	0,204
<i>EcoR</i> 38- <i>Mse</i> 46	0,255	<i>EcoR</i> 42- <i>Mse</i> 40	0,245
<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 35	0,179	<i>EcoR</i> 42- <i>Mse</i> 41	0,221
<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 37	0,222	<i>EcoR</i> 42- <i>Mse</i> 42	0,222
<i>EcoR</i> 41- <i>Mse</i> 38	0,229	<i>EcoR</i> 42- <i>Mse</i> 43	0,250

Para comparar el grado de polimorfismo con respecto al número de bandas totales, se realizó un promedio de los PICs agrupando los iniciadores que otorgaron un número de bandas ≤ 50 y ≥ 50 (Cuadro 4.8.4).

Cuadro 4.8.4: Índices de contenido polimórfico promedio para grupos de combinaciones de iniciadores AFLPs de acuerdo al número de bandas totales.

Nº de bandas totales	PIC
≤ 50	0,2101 (0,025)
≥ 50	0,2296 (0,0258)

(Desvío estándar).

De acuerdo a los valores de PICs obtenidos se puede considerar que, independientemente del número de bandas totales generadas con las distintas combinaciones de iniciadores de AFLPs, se logró la misma información para detectar polimorfismo en estas entradas de amaranto.

4.9 - Comparación entre la información obtenida por los marcadores RAPDs y los AFLPs:

4.9.a - Variación inter-poblacional:

La estimación de la diversidad genética presente en el germoplasma de cualquier cultivo por medio de marcadores moleculares, tiene muchas aplicaciones como complemento de la información morfológica para los mejoradores. El conocimiento del grado en que las líneas o poblaciones están genéticamente relacionadas, puede ayudar al mejorador a decidir qué materiales cruzar o bien a decidir sobre la necesidad de buscar más variabilidad en la naturaleza y obtener así nuevas combinaciones génicas. La determinación de las relaciones genéticas en germoplasmas específicos también sirve para identificar líneas o poblaciones que deben conservarse para mantener o preservar la máxima diversidad genética en bancos de germoplasma.

Cuadro 4.9.1: Síntesis comparativa entre la información obtenida por los caracteres RAPDs y AFLPs.

	RAPDs	AFLPs
Número de iniciadores	50	22
Número de loci	687	1394
Número medio de loci / experimento	13,7	63,4
Número de marcadores polimórficos	526 (76,6%)	897 (64,3%)
Porcentaje medio de polimorfismo / iniciador	69,8%	61,2%
Número de marcadores especie-específicos	302 (44%)	439 (31,5%)
Número de marcadores entrada-específicos	25	98
PIC promedio y su desvío estándar	0,2469 ± 0,1081	0,2207 ± 0,0269

A pesar de que un gran número de marcadores fueron polimórficos y la tasa de polimorfismo por iniciador también fue elevada en ambas técnicas, las 20 entradas analizadas en este estudio compartieron, independientemente de

la especie y el origen de cada una, una gran proporción de los marcadores RAPDs (55,75%) y AFLPs (68,86%) empleados en este análisis, lo que sugiere un elevado grado de homología genética entre estos materiales cultivados.

El cuadro 4.9.1 contempla algunas de las comparaciones establecidas entre los caracteres RAPDs y AFLPs. Como se puede apreciar el porcentaje de polimorfismo por iniciador entre ambos tipos de marcadores fue un 8% superior en RAPDs. Una diferencia mayor se estableció en el porcentaje de polimorfismo con el total de marcadores generados, siendo un 12% superior en RAPDs. Los índices de contenido polimórfico promedio fueron similares en ambas técnicas.

Aunque se establecieron 439 marcadores AFLP especie-específicos y 302 en RAPDs, cuando se compara el porcentaje de los mismos, este fue un 12,5% superior en RAPDs. Cuando se examina cómo se distribuye cada población de caracteres por la cantidad de marcadores especie-específicos, se advierte que la mayor diferencia es en *A. cruentus*. En las nueve entradas de esta especie se generaron 123 marcadores más en la técnica de AFLP que con la técnica de RAPD. En cambio para el resto de las especies no hubo diferencias en el número de marcadores específicos desarrollados por las dos técnicas; es así que al restar los 123 marcadores de *A. cruentus* del total de AFLPs, queda prácticamente el mismo número obtenido con RAPDs.

Otra gran diferencia encontrada entre ambos tipos de caracteres es la cantidad de marcadores únicos para cada entrada. En RAPDs se obtuvieron 25 con los cuales se identificaron con bandas específicas a nueve entradas (Cuadro 4.5.1), en cambio en AFLPs se establecieron 98 marcadores entrada-específicos identificando a 17 de las entradas caracterizadas (Cuadro 4.8.1).

El porcentaje de polimorfismo intra-específico, calculado para ambos tipos de marcadores, se estimó como la proporción de loci polimórficos con respecto al total de loci establecidos entre las entradas de cada especie. Con

AFLPs y RAPDs un gran porcentaje de los caracteres fue monomórfico (~80 a 99%). Sin embargo, el polimorfismo detectado por la técnica de RAPDs fue suficiente para distinguir a la mayoría de estos materiales entre sí, con la combinación de caracteres o con sólo un marcador genético. Mientras que el mayor número de marcadores únicos para cada especie y entrada en los loci de AFLPs (Cuadro 4.9.1) se vio reflejado en la posibilidad de establecer patrones de *fingerprints* para cada una de las entradas analizadas.

Con la finalidad de observar el grado de variabilidad genética entre las entradas analizadas de cada especie, se emplearon los valores de similitud determinados con ambos coeficientes de asociación y se calculó el valor de similitud genética promedio para cada tipo de marcador molecular (Cuadro 4.9.2).

Cuadro 4.9.2: Promedio de similitud genética de las matrices de similitud para cada especie y tipo de marcador molecular.

	RAPDs	AFLPs
<i>A. cruentus</i>	0,9936 (0,0043)	0,9794 (0,0101)
<i>A. hypochondriacus</i>	0,9025 (0,0445)	0,9088 (0,0342)
<i>A. mantegazzianus</i>	0,9915 (0,0035)	0,9720 (0,0127)
<i>A. caudatus</i>	0,9329(0,0412)	0,9276 (0,0319)

() Desvío estándar.

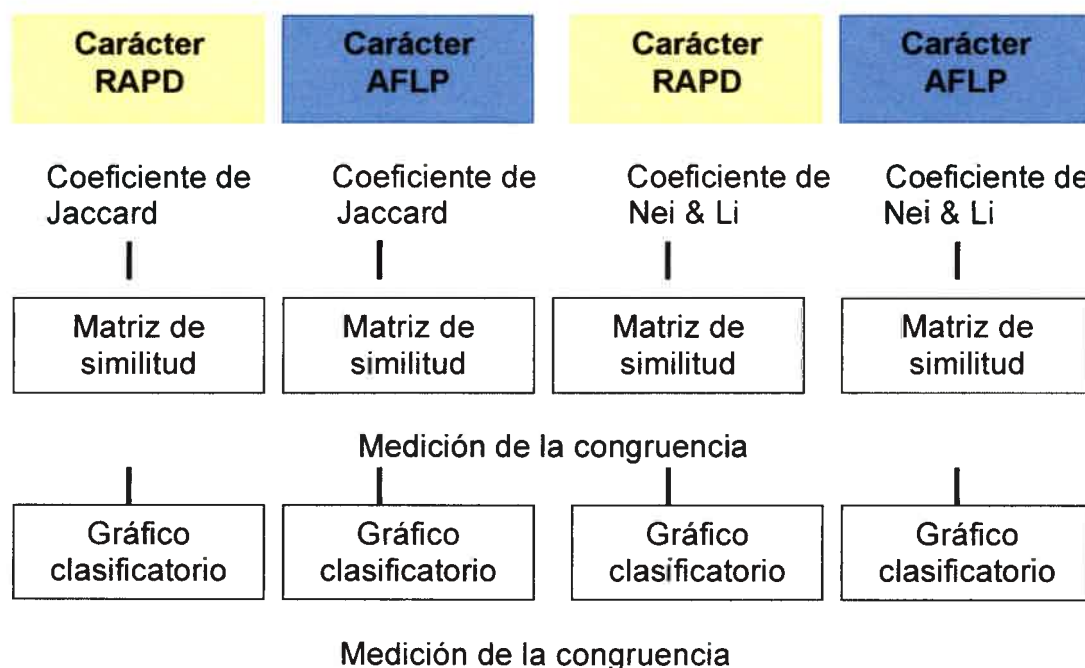
El polimorfismo fue más aparente entre las entradas seleccionadas de *A. hypochondriacus* y entre las entradas de *A. caudatus*, que las correspondientes a *A. cruentus* y a *A. mantegazzianus* con ambos tipos de marcadores moleculares.

Las matrices de similitud con los dos grupos de caracteres genéticos se compararon por el coeficiente producto-momento de Pearson. Para las matrices de similitud calculadas por el coeficiente de asociación de Jaccard la correlación fue de $r = 0,955$ y para las matrices estimadas por el índice de Nei &

Li r = 0,948. También se evaluó la correlación de las matrices cofenéticas derivadas de sus respectivos dendrogramas. Para las matrices cofenéticas, derivadas de la asociación calculada según Jaccard c.c.c = 0,957 y para las matrices cofenéticas derivadas del coeficiente de Nei y Li más la técnica de UPGMA c.c.c = 0,967. De acuerdo con Crisci y Lopez Armengol (1983) se puede señalar que con los valores de los coeficientes r obtenidos, existe una elevada correlación de las relaciones genéticas establecidas por los dos tipos de caracteres genoma-específicos en estas 20 entradas.

Se denomina congruencia al grado de correspondencia entre diferentes clasificaciones de un mismo conjunto de organismos. Dos clasificaciones son congruentes si postulan los mismos agrupamientos (Farris, 1971; Mickevich, 1978). Experimentalmente este análisis puede realizarse variando la metodología de evaluación y/o variando el conjunto de caracteres (Fig. 4.9.1) (Crisci y Lopez Armengol, 1983). La congruencia puede definirse visualmente al comparar las estructuras de los fenogramas o bien puede medirse por el coeficiente de correlación.

Figura 4.9.1: Evaluación de la congruencia taxonómica variando la naturaleza de los caracteres y las técnicas de clasificación.



En este trabajo, se utilizaron las dos alternativas para determinar la congruencia de la clasificación de estas entradas con los marcadores genéticos generados por las dos técnicas. Distintos autores han estimado que ambos tipos de marcadores (RAPDs y AFLPs) están distribuidos al azar en todo el genoma de otros organismos (Vos *et al.*, 1995; Williams *et al.*, 1993). Asumiendo que esto mismo sucede en amaranto, las similitudes genéticas calculadas con marcadores RAPDs y AFLPs deberían proveer una visión representativa de las reales diferencias entre genomas.

Los coeficientes de correlación tomaron, para todas las combinaciones posibles de caracteres vs. caracteres, coeficientes de asociación vs. coeficientes de asociación y caracteres vs. coeficientes de asociación, valores superiores a 0,95 (ver 4.4 y 4.7), determinando una muy buena correspondencia en las relaciones establecidas para estas entradas con estos marcadores. La distribución de los genotipos en los fenogramas basados en marcadores RAPDs y AFLPs (Figs. 4.4.6 y 4.4.7, 4.7.5 y 4.7.6), al compararlos visualmente fue muy similar, y a la vez congruente con la asignación de las 20 entradas a la especie de amaranto granífero, según la clasificación previa de las mismas realizada por caracteres morfológicos (ver 3.1).

A su vez, el agrupamiento de las entradas en la especie *A. hypochondriacus* y en *A. caudatus* fue idéntico en los gráficos de ambos marcadores moleculares, sugiriendo que los dos tipos de marcadores de ADN proveen una información similar sobre las relaciones genéticas de estas entradas. En cambio, en la especie *A. cruentus*, visualmente hay correspondencia en las asociaciones establecidas por ambos tipos de coeficientes de similitud para cada tipo de marcador molecular, pero esta correspondencia no se observa cuando se comparan ambos tipos de marcadores. Quizás el factor que más influyó en esta variación, es la poca cantidad de marcadores polimórficos hallados entre estas nueve entradas, especialmente en RAPDs donde el porcentaje de monomorfismo fue de 98%, encontrándose sólo marcadores específicos en la línea experimental G14/4. Chan y Sun (1997) realizaron un estudio sobre la diversidad

genética y las relaciones establecidas intra e inter-específicamente en *Amaranthus* cultivados y naturales, empleando marcadores RAPDs e isoenzimas. Estos autores encontraron que, dentro del grupo de amarantos graníferos analizados, *A. cruentus* tuvo el menor valor de polimorfismo con marcadores RAPDs (31,5%). Ellos consideran que este resultado se debe a que *A. cruentus* es la especie granífera más importante del género (Grubben y van Sloten, 1981), por lo que probablemente experimentó la mayor presión de selección en el proceso de domesticación, resultando así en la especie con menor variación genética, como se observa con el análisis de marcadores de isoenzimas, RAPDs y también ahora con AFLPs.

Otra diferencia visual entre estos gráficos fue el arreglo de los grupos inter-específicos, en este caso con marcadores RAPDs las dos entradas de *A. mantegazzianus* demostraron ser genéticamente más similares a las entradas de *A. caudatus*, mientras que con caracteres AFLPs, las entradas correspondientes a *A. caudatus* resultaron más similares a las entradas de *A. hypochondriacus*. Varias pueden ser las causas de estas diferencias en el establecimiento de las relaciones genéticas inter-específicas. Una de ellas es que, aunque se asume que ambos marcadores están distribuidos al azar en todo el genoma, se ha empleado una muestra de los mismos para comparar a estas entradas lo cual está siempre afectado de error. Otra causa puede ser que no exista realmente un 100% de homología entre fragmentos de igual peso molecular tanto en caracteres RAPDs como en AFLPs, particularmente cuando se comparan especies. A este respecto, Thormann y Osborn (1992) realizaron un estudio en *Brassica* con caracteres RAPDs y RFLPs, en donde explican que la falta de congruencia entre los dendrogramas a nivel inter-específico se debía a la falta de homología entre fragmentos de RAPDs con igual peso molecular, hecho corroborado por el análisis con hibridación por *Southern blot*. Por otro lado, Powell *et al.* (1996) establecieron, al comparar en germoplasma de soja marcadores codominantes y dominantes, que la frecuencia de obtener bandas con igual peso molecular no homólogas, podría incrementarse en marcadores tipo RAPDs y AFLPs, cuando los genotipos comparados son genéticamente

poco similares, provocando una sobrestimación de la similitud genética. Debido a que en AFLPs se utilizan geles de mayor resolución (poliacrilamida) es probable que el error sea menor con esta técnica (Lin *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996).

En las cuatro estructuras arborescentes, independientemente del valor de similitud establecido por el coeficiente de asociación empleado, las entradas G14/4, Don Guiem, Don Armando, G2/1, G6/19, G6, G6/2, G14 y G10/13l todas pertenecientes a *A. cruentus* integraron el grupo de menor similitud genética con las restantes 11 entradas. Este resultado concuerda con el trabajo de Transue *et al.* (1994), quienes emplearon 282 marcadores polimórficos RAPDs, para comparar varios genotipos de tres especies de amarantos graníferos. Ellos establecieron que las entradas de *A. hypochondriacus* y las de *A. caudatus* compartieron el 48,5% de los marcadores evaluados, y ambas especies fueron genéticamente menos similares a *A. cruentus* con la cual sólo compartían el 25% de los marcadores.

Cuando se comparan genotipos por la presencia o ausencia de fragmentos amplificados, la información que se puede obtener varía según que fenotipos se comparan (Skroch *et al.*, 1992). La presencia de un marcador dominante en dos genotipos, indica una alta probabilidad de que la secuencia de dicho fragmento de ADN sea homóloga (Williams *et al.*, 1993). En el caso de que un genotipo presente el marcador y el otro no, existe seguridad de que las secuencias de ADN para ese fragmento son diferentes, aunque no se puede establecer cual es el grado de divergencia entre ambas secuencias. La última posibilidad es que ambos genotipos no presenten amplificación de un fragmento. Este resultado no brinda información acerca de la homología de la secuencia de ADN en dicha posición, debido a que la coincidencia en la ausencia de banda puede ser por una misma sustitución de base por igual en ambos genotipos o, las dos secuencias pueden ser completamente diferentes. Cuando la estimación de las relaciones genéticas es intra-específica, Skroch *et al.* (1992) empleando RAPDs en varias especies vegetales, determinaron que en

cultivares muy similares existe una elevada probabilidad de que las secuencias de ADN en la doble ausencia de fragmentos amplificados también sean idénticas. En este trabajo se establecen las similitudes genéticas entre materiales pertenecientes a distintas especies de amarantos graníferos, desconociéndose el verdadero origen de varios de ellos, por lo que se emplearon los estadísticos de Jaccard y de Nei & Li, que descartan a la doble ausencia de amplificación como componente a favor de la similitud, en la estimación de las relaciones genéticas entre genotipos.

Otra de las diferencias observadas al comparar los dendrogramas es el valor de similitud, escala en el eje x, determinado para cada uno de los grupos según el índice de asociación empleado. Para los dos tipos de caracteres, el índice de Nei y Li estableció mayores coeficientes de asociación intra e inter-especie, que el índice de Jaccard. El índice de Nei y Li le otorga un peso doble a la presencia del fragmento amplificado en los dos genotipos comparados. Esta distinción hace que este coeficiente sea más adecuado utilizarlo en marcadores codominantes en donde se puede observar, por la posición de los fragmentos en el gel, si los dos alelos son iguales o diferentes (Piepho y Laidig, 1997). En cambio en marcadores tipo RAPDs o AFLPs sólo se observa la amplificación del marcador dominante, por lo que con la sola observación del gel, no se puede asumir si el otro alelo es igual o diferente. De este modo con el índice de Nei & Li, al trabajar con marcadores dominantes, se podría cometer el error de sobrestimar las relaciones genéticas reales de los organismos, especialmente cuando la comparación es entre especies.

En este caso cuando se estimó el porcentaje de monomorfismo entre las entradas que correspondían a la misma especie no hubo prácticamente diferencias entre ambos grupos de caracteres. Esto se reflejó también en los fenogramas y coeficientes de similitud obtenidos. A pesar que las entradas de *A. cruentus*, trabajando con AFLPs, obtuvieron una cantidad de fragmentos únicos que correspondió prácticamente al triple del número obtenido por el resto de las entradas, la mayoría de éstas se presentaron en las nueve líneas experimen-

tales y los cultivares sin modificar la información para la identificación de las mismas.

Las comparaciones de los resultados obtenidos entre estos marcadores moleculares indican que el tipo de marcador elegido RAPD o AFLP, fue relativamente importante en determinar las relaciones genéticas entre estas 20 entradas de amaranto. Estas técnicas detectan polimorfismos a través de subzonas en el total de variación contenida en la secuencia de ADN de un genoma. Los polimorfismos detectados por AFLPs reflejan variación de sitios de restricción. Los polimorfismos de RAPDs provienen de la variación del sitio de unión de los iniciadores al ADN y de la diferencia en la longitud del fragmento de ADN entre dos sitios de unión.

Para facilitar la lectura de la información obtenida por cada una de estas técnicas, en la caracterización de estas entradas de amarantos se empleó también el coeficiente denominado cociente múltiple. El número medio de loci por experimento establecido por RAPDs fue de 13,7 y el número medio de AFLPs por experimento fue de 63,4. Powell *et al.* (1996) compararon los marcadores RFLP, RAPD, AFLP y SSR en el análisis de germoplasma de soja, los AFLPs seguido por los RAPDs fueron los marcadores que otorgaron para esta especie un mayor cociente múltiple. A pesar de la gran diferencia intrínseca, que favorece a los AFLPs, en la cantidad de loci promedio analizados por experimento en estos materiales de amaranto, cuando se compara la cantidad de loci polimórficos analizados por experimento, existe una pequeña ventaja de los RAPDs. El rango relativo de polimorfismo de los sistemas de marcadores debería permanecer constante, si los mecanismos que generan polimorfismos en el ADN de las distintas especies son similares. Este resultado ha sido poco examinado. Existen pruebas de que algunas especies como maíz contienen más sistemas activos de transposones que otras, contribuyendo a la generación de un alto número de mutaciones del tipo inserción/delección. En otras especies las mutaciones puntuales de nucleótidos podrían ser el mecanismo predominante en la generación de nuevos alelos. Estas diferencias pueden alterar el rango

relativo de polimorfismo detectado por los diferentes sistemas de marcadores. Mientras que las técnicas de AFLPs y RAPDs son capaces de detectar tanto una mutación puntual de un nucleótido como inserciones y deleciones, la sensibilidad relativa con que ambas evalúan estos cambios puede variar debido a la diferente longitud de las secuencias genómicas generadas y de sus sistemas de resolución con los distintos tamaños de bandas (Powell *et al.*, 1996).

El mayor porcentaje de loci polimórficos hallados en RAPDs puede explicarse al considerar que éstos tienden a residir en zonas de secuencias altamente repetitivas del genoma que corresponden a regiones que son no-codificantes y por lo tanto más susceptibles de acumular mutaciones. Consecuentemente, estos muestran más polimorfismos que las isoenzimas, representativos de regiones más conservadas del genoma (Irwin *et al.*, 1998; Kongiatngam *et al.*, 1995). Los AFLPs son generados por sitios de restricción del genoma, por lo tanto poseerían características intermedias al igual que los marcadores RFLPs.

De Riek *et al.* (1997) ilustraron la importancia de una interpretación adecuada de las bandas para obtener el grupo de datos usado en el cálculo de las similitudes genéticas. Ellos analizaron distintos criterios arbitrarios para interpretar las bandas. La comparación entre los fenogramas mostró que la elección de los datos tiene una fuerte determinación en los fenogramas obtenidos. Tal fenómeno es parte del problema dual que ocurre cuando la identificación se basa en marcadores que no están caracterizados. En todo trabajo se presenta la pregunta de cuántos marcadores deben ser evaluados para lograr una buena representación de las similitudes genéticas entre dos individuos y si además, todos los marcadores detectados tienen un contenido de información sobre variabilidad comparable. Estos autores proponen como estrategia para la caracterización de diferentes entradas, que los marcadores moleculares deben ser elegidos a partir de un mapa genético cubriendo intervalos regulares del cromosoma.

Entre los diversos factores que pueden afectar la estimación de la variabilidad genética entre distintas entradas, se encuentran el número de marcadores utilizados y la distribución de éstos en el genoma (Powell *et al.*, 1996). El número de marcadores puede aumentarse hasta establecer una buena relación genética entre las entradas y, con respecto a la distribución de éstos en el genoma, debería utilizarse marcadores que no estén genéticamente ligados, asegurando resultados independientes. Actualmente no existe un mapa genético de amaranto, por lo que se desconoce la posición relativa de los marcadores genéticos desarrollados en este trabajo, como tampoco se realizó un estudio del grado de independencia de los marcadores moleculares mediante cruza-mientos ad hoc y posteriores análisis de segregación. De acuerdo a los resultados, asumimos que el número de marcadores desarrollados fue suficiente para establecer las relaciones genéticas entre las 20 entradas analizadas con los marcadores RAPDs y AFLPs, y que el desconocimiento de la distribución de éstos en el genoma de amaranto podría producir una distorsión de la información sobre la variabilidad estimada, al otorgarle un peso relativo mayor a los polimorfismos localizados en una misma región cromosómica. De hecho, a priori podríamos suponer que los marcadores AFLPs obtenidos tienen un mayor error de muestreo que los marcadores RAPDs, porque en la mayoría de las combinaciones de iniciadores se mantuvo constante el iniciador *EcoRI* (ver Cuadro 4.7.1).

Aunque el número de loci analizados por experimento fue 4,6 veces superior en la técnica de AFLP, al comparar el nivel de información de los PICs otorgado por ambas técnicas, en estas 20 entradas, hace pensar que los RAPDs pueden ser los marcadores elegidos para futuras caracterizaciones y estimaciones de las relaciones genéticas entre entradas de amarantos, por ofrecer la ventaja de ser técnicamente más sencillos, requerir poca cantidad de ADN, no utilizar poliacrilamida, y ser relativamente más rápidos de desarrollar que los AFLPs.

4.9.b - Patrones de *Fingerprints*:

Con el total de caracteres analizados, se pudo establecer patrones especie-específicos a partir de estas 20 entradas. En el cuadro 4.9.1 se resume que 302 marcadores RAPDs y 439 marcadores AFLPs fueron compartidos sólo entre entradas de una de las especies de amarantos graníferos. Cualquiera de estos tipos de caracteres puede ser empleado para complementar la información morfológica de las restantes entradas identificadas de estas especies, conservadas en el banco de germoplasma de amaranto de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC.

A pesar de que el polimorfismo intra-específico fue bajo, los marcadores RAPDs y AFLPs determinados entre estas entradas fueron lo suficientemente polimórficos como para establecer patrones de *fingerprints* únicos, para varias de las entradas con relativamente pocos loci (Cuadros 4.5.2 y 4.8.1).

Una diferencia sustancial encontrada entre ambos caracteres fue la cantidad de marcadores entrada-específicos, 25 en RAPDs y 98 en AFLPs. Esta diferencia permitió que en AFLPs se pudiera establecer patrones de *fingerprints* para identificar a cada una de las 20 entradas, en cambio en RAPDs la combinación de varios marcadores permitió identificar a 16 de las 20 entradas. Los genotipos que no fueron identificados pertenecen a *A. cruentus*, especie que presentó mayor similitud genética entre sus materiales. He y Prakash (1997) utilizando RAPDs y AFLPs para identificar materiales de *Capsicum annum*, encontraron que los marcadores AFLP producen cuatro veces más productos polimórficos por iniciador y resultan más efectivos para detectar polimorfismos aún en materiales de pimiento genéticamente muy similares, los que no pudieron ser identificados por marcadores RAPDs. Contrariamente, Paran *et al.* (1998) al realizar estudios utilizando marcadores AFLP y DAF (DNA Amplification Fingerprinting, una de las variantes de RAPDs) para identificar materiales de *Arachis hypogaea*, encontraron que el número promedio de productos polimórficos por iniciador fue similar entre ambas técnicas en un grupo de cultiva-

res de maní genéticamente muy similares. No obstante el número de iniciadores capaces de detectar polimorfismos fue muy superior en AFLPs. Estos resultados indican que para cada especie en particular y, para el grupo de entradas que de ella se evalúen, se requerirá establecer la técnica o grupo de técnicas más informativas para responder al objetivo propuesto.

La ventaja de la técnica de AFLP con respecto a la de RAPD sería el mayor número de bandas logrado por experimento, lo que incrementa la posibilidad de encontrar marcadores polimórficos, aunque intrínsecamente el método de AFLP no necesariamente debe detectar más polimorfismo que el de RAPDs. En este trabajo la cantidad de bandas por experimento lograda por la técnica de AFLP fue 4,6 veces superior a la de RAPDs. Sin embargo, la diferencia entre ambas para establecer patrones de *fingerprint* no radicó en el porcentaje de polimorfismo por iniciador sino en la cantidad de bandas entrada-específicas. De acuerdo a estos resultados en ambas técnicas la densidad de marcadores fue adecuada para determinar la similitud genética entre entradas genéticamente distantes. En cambio, cuando las entradas fueron muy semejantes (*A. cruentus*) ambas técnicas produjeron una asociación genética diferente, quizás por ser insuficiente la cantidad de marcadores generados. El cociente múltiple puede ser en este caso manipulado experimentalmente para aumentar el número de marcadores, por ejemplo en AFLPs con la extensión del extremo 3' de los iniciadores o intercambiando distintas enzimas de restricción (Zabeau y Vos, 1993). Igualmente, los métodos de resolución y detección tales como el uso de radioactivos, bromuro de etidio, teñido de plata, junto con las condiciones de amplificación pueden influenciar el cociente múltiple en RAPDs (Caetano-Anolles *et al.*, 1991; Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990).

Paran y Michelmore (1993) convirtieron marcadores RAPDs en Sequence Characterised Amplified Regions (SCARs) y luego diseñaron pares de iniciadores específicos para realizar PCR, con los polimorfismos únicos logrados previamente por la técnica de RAPDs. Los SCARs presentan la ventaja con respecto a los marcadores RAPDs y a los AFLPs que sólo detectan un locus,

su amplificación es menos dependiente de las condiciones de la reacción y potencialmente pueden convertirse en marcadores codominantes.

Otra utilidad de estos fragmentos polimórficos de RAPDs y AFLPs es emplearlos como sondas en la técnica de RFLP. Pudiendo de esta manera transformar a estos marcadores dominantes en codominantes.

Con estos marcadores es posible investigar el ligamiento entre secuencias amplificadas específicas de ADN y caracteres genéticos de relevancia económica, tales como resistencia o tolerancia a estrés bióticos y abióticos (Castiglione *et al.*, 1993).

Cuando se compara la información otorgada por cada una de estas técnicas, para establecer patrones de *fingerprinting* en las 20 entradas, se puede concluir que inter-específicamente ambas son muy similares, como lo observado tras el análisis de coordenadas principales (figuras 4.5.1 y 4.8.1). La comparación directa de los gráficos de coordenadas principales muestra nuevamente la habilidad de estos marcadores en distinguir las cuatro especies de amarantos graníferos estudiadas. Determinando que los RAPDs y/o AFLPs pueden ser empleados efectivamente para clasificar las entradas de amarantos graníferos a su correspondiente especie, según la concordancia observada con la clasificación morfológica anterior.

La mayoría de los estudios que utilizan RAPDs para la estimación de la diversidad genética optan por considerar la presencia o ausencia de los productos amplificados, en las matrices de similitud y los coeficientes de similitud asimétricos simples son los más ampliamente usados (ejemplo Índice de Nei & Li y de Jaccard). Algunos autores (Demeke *et al.*, 1992) han empleado medidas de similitud más complejas y eligieron la interpretación de la intensidad de las bandas como un estado del carácter evaluado, argumentando que la información de los productos RAPDs puede perderse en parte cuando la intensidad de los fragmentos es ignorada. Sin embargo la interpretación de los perfiles sólo

como presencia/ausencia puede justificarse en el hecho de que es desconocida la causa de la variación en la intensidad de las bandas (Harris, 1995). Estudios de hibridación molecular han mostrado que fragmentos de igual peso molecular no poseen la misma secuencia de ADN (Thormann y Osborn, 1992). No es correcto pensar que las diferencias observadas en la intensidad de bandas, se deba a la presencia del doble de la secuencia *target* en un individuo homocigota, ya que esta diferencia es enmascarada por los numerosos ciclos de amplificación de los fragmentos de ADN que tiene lugar durante la PCR (Newbury y Ford-Lloyd, 1993).

Para estimar la capacidad de los iniciadores en la identificación de las cuatro especies de amarantos consideradas, los datos obtenidos por cada uno fue procesado independientemente. Los iniciadores OPB06, OPA19, OPC20, OPC14, OPB10 y OPA01 de RAPDs y los iniciadores 38-44, 38-46 y 42-40 de AFLPs fueron los que mostraron bandas específicas en todas las especies de amarantos analizadas.

Las entradas G10/13I y G16183/14 fueron las que mostraron cierta variabilidad intra-cultivar con marcadores RAPDs (<5%) (ver 4.3), sin embargo estas entradas no presentaron una mayor cantidad de caracteres únicos que el resto de las entradas, sugiriendo en parte, que el nivel de homogeneidad detectado por los 53 marcadores fue adecuado.

Cuando la caracterización a establecer es entrada-específica, el grupo de caracteres AFLPs utilizado demostró ser más informativo que los caracteres de RAPDs desarrollados para estas 20 entradas. Una posible causa del bajo polimorfismo entrada-específico en RAPDs puede ser porque esta técnica es poco sensible para detectar las pequeñas diferencias en tamaño de los productos amplificados. Utilizando geles de poliacrilamida en la resolución de las bandas o aumentando la concentración de agarosa podría superarse esta limitación (Vierling y Nguyen, 1992).

4.10 - Antecedentes sobre *Fingerprinting* por caracteres isoenzimáticos:

En estas 20 entradas se conocían sus patrones isoenzimáticos (Bonamico *et al.*, 1998). Los sistemas empleados fueron: Malato dehidrogenasas (MDH), 6-Fosfogluconato dehidrogenasas (PGD), Fosfatasa Ácida (ACP), Alcohol dehidrogenasas (ADH), Leucina aminopeptidasas (LAP), Enzima mállica (ME) y Esterasas (EST). Cada banda, al igual que los caracteres RAPDs y AFLPs, representó a un locus con dos alelos los que corresponden a la presencia/ausencia de las bandas en el gel. Con estos siete sistemas se lograron establecer marcadores polimórficos entre los materiales analizados.

Sin embargo, con estos datos no se estimaron las relaciones genéticas entre las entradas porque se generaron pocos marcadores moleculares y a su vez, estos sistemas fueron elegidos por ser los más polimórficos en los trabajos de Hauptli y Jain (1984) y Neumann *et al.* (1994), sobre estas especies. Por lo tanto, la variabilidad genética de estas entradas estaría sobrestimada con estos caracteres elegidos por ser polimórficos.

En el cuadro 4.10.1 se establecieron los patrones de *fingerprintings* que identifican a las 20 entradas de amarantos. Con el empleo de 24 marcadores isoenzimáticos de diferente nivel de especificidad se pudieron establecer patrones únicos para todos los genotipos. Además se encontraron tres marcadores entrada-específicos MDH/4 en G1, ADH/1 en G6/1 y EST/2 en G14.

Cuadro 4.10.1: *Fingerprintings* establecidos con 24 marcadores isoenzimáticos para las 20 entradas analizadas.

Marcador	<i>A. cruentus</i>				<i>A. hypochondriacus</i>			<i>A. mantegazzianus</i>		<i>A. caudatus</i>							
	D.Guilem G14/4	G6/2	G14	G2/1	G6/19	G10/13I	D.Arm. G6	G1	G6/1	G1/3	Artasa	D.Juan G1/3b	G16/183/14	G14/14a	G16/12I	G16/186/16	G10/3
MDH/1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
MDH/2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MDH/4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDH/8	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ME/1	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ME/2	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
ME/3	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ME/4	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
ME/5	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
PGD/1	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PGD/2	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PGD/4	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ACP/1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+
ACP/2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
ADH/1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH/3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
LAP/1	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAP/2	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAP/3	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LAP/4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
EST/1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
EST/2	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EST/3	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-
EST/4	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-

Cada marcador fue denominado por el código de la enzima seguido por un número otorgado a la banda, según su posición relativa en el gel desde el ánodo. (+) Presencia de la banda, (-) Ausencia. (Bonamico *et al.*, 1998).

Aunque una banda presente sólo en una entrada es útil para su identificación, esta carece de utilidad para el agrupamiento de las entradas en un grupo genéticamente relacionado. Esto ocurre en la mayoría de los marcadores isoenzimáticos encontrados con estos siete sistemas en amaranto.

A diferencia de lo ocurrido con RAPDs y AFLPs los caracteres isoenzimáticos fueron en su mayoría polimórficos pero no se generaron marcadores especie-específicos. La proporción de marcadores que fueron diagnósticos de entradas fue 25/687 (3,64%) en RAPDs, 98/1394 (7,03%) en AFLPs y 3/36 (8,33%) en isoenzimas. La similitud de estos porcentajes sugiere que la ventaja de los marcadores RAPDs y AFLPs sobre las isoenzimas, para caracterizar a estas entradas, recae primeramente en la habilidad de estas técnicas en generar un mayor número de marcadores por experimento.

Los marcadores bioquímicos y moleculares no han sido aceptados hasta el presente como una medida satisfactoria de diferenciación para el registro de nuevas variedades, pero pueden ser empleados para demostrar la identidad de las mismas. Consecuentemente, se pueden convertir en la herramienta más efectiva para defender una variedad una vez que su distinción ha sido probada y aceptada por métodos de caracterización y evaluación más tradicionales (Castiglione *et al.*, 1993)

En los principales cultivos y en las especies de mayor importancia económica, numerosos marcadores han sido desarrollados siendo los RFLPs en particular, los que proveerán una importante información genética. Sin embargo, en los cultivos menos tradicionales, de menor importancia económica y en las especies subexplotadas, como también en pequeñas investigaciones donde los RFLPs no pueden emplearse por su elevado costo experimental, pueden desarrollarse los marcadores no-específicos tales como RAPDs y AFLPs y específicos como isoenzimas.

4.11 - Variación inter-poblacional de los marcadores RAPDs y los AFLPs:

Es muy útil considerar qué grado de la diversidad genética existente en un genoma será revelado por cada marcador molecular en particular (Lanaud y

Lebot, 1995). Cualquiera sea la naturaleza de los caracteres empleados para establecer las relaciones genéticas, como también para definir patrones de *fingerprinting* entre distintos materiales vegetales, está supeditada a error. Esto es debido a que la identificación es una referencia, pues se trabaja sobre una muestra de individuos de cada genotipo, y a que el número de caracteres evaluados siempre corresponde a una muestra más o menos representativa de la variación total presente en los materiales comparados. Como también cada carácter por si mismo tiene su propia fuente de variación, es conveniente al establecer las relaciones genéticas entre diferentes organismos contar con el mayor número y naturaleza de caracteres posibles.

Establecida la concordancia entre las muestras de caracteres RAPDs y AFLPs se construyó una matriz básica conteniendo el total de marcadores moleculares los que sumaron 2081 bandas de ADN.

Con esta matriz se realizaron los mismos análisis estadísticos que los contemplados para cada tipo de caracteres por separado. En la figura 4.11.1 se encuentra el fenograma de las 20 entradas empleando el coeficiente de Jaccard en la matriz de similitud. Mientras que, en la figura 4.11.2 se encuentra el fenograma de las mismas entradas utilizando previamente el coeficiente de Nei y Li en la matriz de similitud.

Figura 4.11.1: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y AFLPs y el coeficiente de Jaccard.

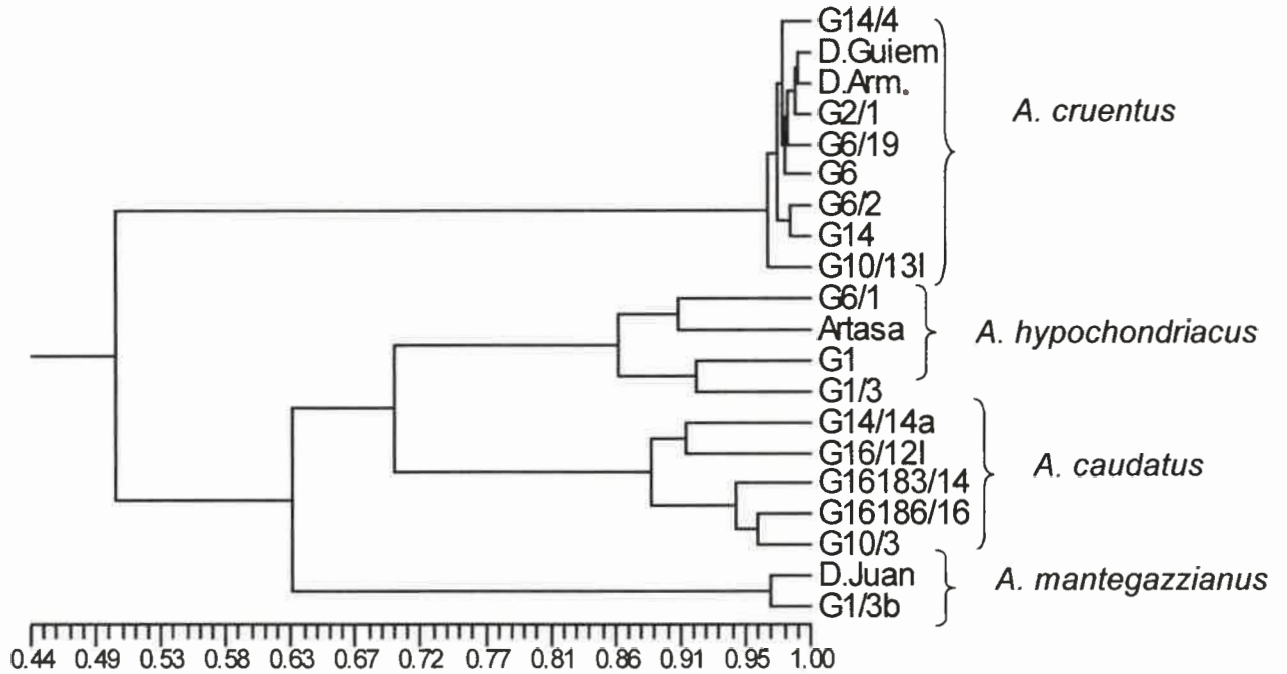
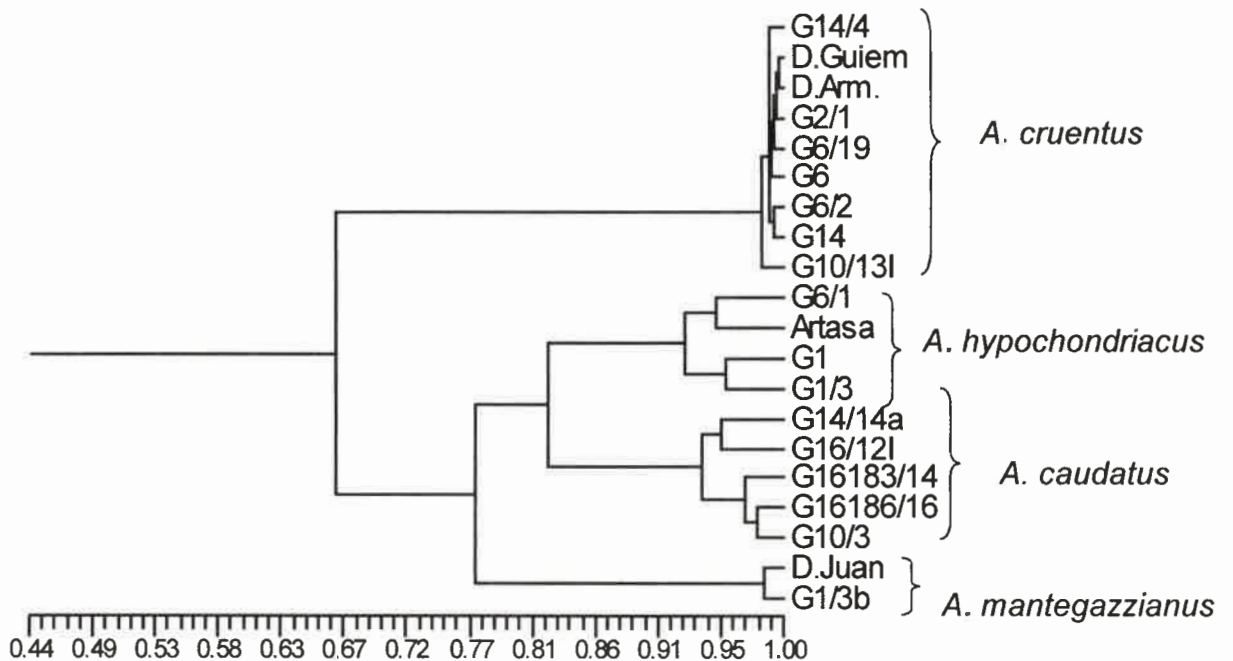


Figura 4.11.2: Fenograma obtenido por la técnica de agrupamiento UPGMA para los marcadores RAPDs y AFLPs y el coeficiente de Nei & Li.



Al igual que lo observado para ambos caracteres tratados individualmente, la opción FIND del programa NTSYS-pc determinó en los dos casos una sola estructura arborescente.

El coeficiente de correlación cofenético estimado entre la matriz de similitud calculada por el coeficiente de Jaccard y la matriz cofenética del fenograma fue de c.c.c. = 0,996. Este mismo coeficiente estimado para la matriz de similitud generada con el índice de Nei y Li y la matriz cofenética de su representación gráfica fue c.c.c. = 0.994.

Finalmente la correlación establecida entre ambas matrices de similitud fue de $r = 0,998$ y entre las dos matrices cofenéticas $r = 0,998$. Estos coeficientes muestran la muy buena correspondencia entre los dos tratamientos estadísticos realizados al mismo tipo de datos. Además visualmente se observa, como era de esperar, la excelente correspondencia entre los agrupamientos producidos al emplear todos los caracteres en una misma matriz y con cada grupo de marcadores por separado.

Las asociaciones de las 20 entradas fue idéntica a las establecidas por los caracteres AFLPs. Las similitudes genéticas inter-específicas, fueron levemente menores, esto se explica al considerar que los caracteres RAPDs cuando se trataron independientemente, reflejaron una menor similitud genética a este nivel entre estos materiales.

Transue *et al.* (1994) estimaron con el empleo de caracteres RAPDs las asociaciones genéticas entre 111 entradas de amarantos graníferos. Estas entradas compartieron valores de similitud en un rango de 0,85 a 1 como las 20 analizadas en este trabajo con marcadores RAPDs y AFLPs. En un estudio similar Chan y Sun (1997) encontraron pocos polimorfismos en isoenzimas y RAPDs, analizando cinco entradas de cada una de las especies de amarantos graníferos. Contrariamente, Ranade *et al.* (1997) lograron obtener polimorfismos intra e inter-específicos de marcadores RAPDs en tres entradas de *A.*

caudatus y en tres entradas de *A. hypochondriacus*, aunque el agrupamiento de las mismas fue confuso.

Las entradas de *A. mantegazzianus* caracterizadas por marcadores RAPDs en este estudio fueron junto con las entradas de *A. caudatus* las que compartieron el mayor número de caracteres, aunque integraron dos grupos de asociación diferentes. En cambio en AFLPs y con el conjunto de todos los marcadores generados (Figs. 4.11.1 y 4.11.2), los dos grupos de genotipos se distanciaron de manera significativa. En la bibliografía de amarantos se utilizan numerosas sinonimias para designar a cada una las especies graníferas *A. hypochondriacus* = *A. flavus* L. = *A. leucocarpus* S., *A. cruentus* = *A. paniculatus* L. y *A. mantegazzianus* = *A. edulis* Speng. (Gruben y van Sloten, 1981). Hunziker (1943, 1951, 1952) ha considerado a los amarantos graníferos andinos como miembros de dos especies estrechamente relacionadas. Una de ellas *A. mantegazzianus* (*A. edulis*) limitada al noroeste de Argentina y la otra *A. caudatus* de una distribución más amplia. Pal y Khoshoo (1972, 1973a) y Khoshoo y Pal (1972) aportaron evidencias acerca de las relaciones genéticas entre estas especies, ambas se cruzaron y produjeron una F1 semifértil mostrando relaciones de cruzamiento paralelas con *A. hybridus* y *A. hypochondriacus*. Sin embargo, entre los híbridos de *A. mantegazzianus* y *A. caudatus* mostraron una mortalidad elevada de plántulas y reducción del vigor de plantas en la F2. Sobre estos resultados Pal y Khoshoo (1972) concluyeron que las dos especies debían considerarse separadas. *A. mantegazzianus* correspondería a una especie derivada de los especímenes ornamentales de *A. caudatus*. Contrariamente, Coons (1982) sugirió que la debilidad de los híbridos no necesariamente está correlacionada con la diferenciación morfológica de los padres debilitando el reconocimiento de *A. mantegazzianus* como una especie separada de *A. caudatus*. Esta autora evaluó individuos de las dos variantes y estableció que las diferencias morfológicas entre ellas no eran sustanciales como para considerarlas especies distintas. Zhelenov *et al.* (1997) utilizando el análisis de las proteínas de almacenamiento seminales determinaron que *A. caudatus* y *A. mantegazzianus* están filogenéticamente relacionadas, y que la últi-

ma probablemente es el ancestro de *A. caudatus*. Aunque en nuestro trabajo sólo se incluyeron dos entradas de *A. mantegazzianus* y cinco de la especie *A. caudatus*, se lograron establecer grupos de asociación diferentes. Nuestros resultados permiten determinar que la información de los marcadores moleculares de RAPD y AFLP podría complementar a la discusión taxonómica realizada hasta el momento con datos morfológicos y de proteínas. Para ello, se requerirá la inclusión de un mayor número de entradas de ambas especies.

Las primeras labores de fitomejoramiento realizadas en el país dieron origen a los cultivares Don Juan, Don Guiem y Don Armando, obtenidos en la estación experimental de INTA, Anguil (La Pampa). Los cultivares Don Guiem y Don Armando, ambos de *A. cruentus*, se diferencian porque el primero es de panoja vercosa en cambio Don Armando es de panoja purpúrea; ambos son de porte similar y muestran insensibilidad al fotoperíodo (Covas, 1994a). Estos dos cultivares fueron seleccionados a partir de una misma población original. Las líneas experimentales G6, G6/19 y G6/2 obtenidas en la misma institución posiblemente hayan sido obtenidas de los mismos materiales anteriores. Esto explica en parte el elevado porcentaje de monomorfismo hallado por los marcadores de ADN en estos materiales de *A. cruentus*. Las entradas G1 y G1/3 de *A. hypochondriacus* fueron seleccionadas a partir de una misma población, aunque forman parte del mismo grupo en todos los fenogramas, entre ellas existe la suficiente variabilidad genética como para caracterizarlas por ambos tipos de marcadores.

CONCLUSIONES

En este trabajo se estableció la capacidad de los marcadores moleculares RAPDs y AFLPs para caracterizar, establecer patrones de *fingerprinting* y estimar las similitudes genéticas de 20 entradas pertenecientes a cuatro especies de amarantos graníferos.

Sobre un total de 2081 loci analizados el 62,3% fueron compartidos entre entradas de las cuatro especies, confirmando la estrecha base genética de este cultivo. Aparte se establecieron 741 loci especie-específicos y 123 loci entrada-específicos los que podrán ser empleados como información complementaria a los caracteres morfológicos en la caracterización e identificación de estos materiales.

Siendo la técnica de RAPD más rápida y con menores requerimientos técnicos que la desarrollada para AFLP permite seleccionar a los marcadores como más apropiados para estimar las relaciones genéticas entre estas entradas de amaranto y por la mejor aproximación entre los agrupamientos observados con estos caracteres y los caracteres morfológicos.

Debido a que la muestra de entradas fue pequeña, será necesario un análisis más detallado para confirmar estos patrones de variación intra-específicos particularmente, en *A. mantegazzianus* en donde sólo se emplearon dos entradas.

En este estudio se establece la primera referencia del empleo de la técnica de AFLP en amaranto, demostrando ser más informativa con respecto a los marcadores RAPDs para la determinación de patrones de *fingerprinting* específicos de entrada.

De acuerdo a los resultados obtenidos podemos concluir que los marcadores RAPDs y AFLPs podrán utilizarse como herramientas complementarias para la caracterización, conservación y utilización de otros materiales del germoplasma de amaranto.

Anexo 4.4.1: Matriz básica de marcadores RAPDs.

marcador	G10/3	G16186/16	G16/121	G14/14a	G16183/14	G1/3b	D. Juan	Arfasa	G1/3	G6/1	G1	G6	D. Arm.	G6/19	G10/131	G2/1	G14	G2/1	G14	G6/2	D. Guillem	G14/4
OPA01/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA01/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA01/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA03/1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA03/2	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA03/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA03/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA04/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA04/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA04/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA04/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA04/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA04/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA04/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA04/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0

OPA04/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA05/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA05/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA08/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPA08/3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
OPA08/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA08/5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA08/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA08/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA08/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1
OPA08/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1
OPA08/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPA08/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA09/2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA09/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA09/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA09/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPA09/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA09/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OPA10/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPA10/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA10/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA10/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1
OPA10/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
OPA12/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA12/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA12/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA12/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA12/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA12/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA12/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPA12/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA12/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA12/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA12/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA12/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA12/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA12/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
OPA13/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA13/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA13/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA13/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA13/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA14/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA14/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA14/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA14/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA14/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA14/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

OPA14/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA14/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA14/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA14/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA14/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA14/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA14/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA14/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA14/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA14/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA15/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPA15/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPA15/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA15/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
OPA15/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA15/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
OPA15/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA15/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA15/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA15/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA18/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA18/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA18/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPA18/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0
OPA18/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
OPA18/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/28	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA18/29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
OPA19/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA19/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA19/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA19/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

OPA19/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA19/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
OPA19/7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPA19/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA19/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA19/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPA19/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0
OPA19/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPA19/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPA19/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA19/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA19/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA19/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA19/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
OPA19/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPA20/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA20/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA20/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPA20/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA20/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA20/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA20/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPA20/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPA20/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPA20/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
OPA20/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
OPB05/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB05/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB05/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB05/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPB05/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB05/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB05/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB05/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
OPB05/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB05/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB05/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB05/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB05/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPB05/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPB05/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPB05/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB05/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB05/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB06/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPB06/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB06/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB06/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0
OPB06/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB06/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB06/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB06/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB06/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

OPB06/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB06/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
OPB06/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
OPB06/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB06/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPB06/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB06/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB06/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB10/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB10/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB10/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB10/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB10/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB10/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB10/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB10/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB10/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1
OPB10/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB10/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB10/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPB10/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
OPB10/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB10/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB10/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB12/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB12/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB12/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB12/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1
OPB12/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB12/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB13/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB13/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB13/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB13/4	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB13/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPB13/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB13/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB13/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPB14/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB14/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB14/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB14/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPB14/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPB14/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
OPB14/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB14/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
OPB14/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPB14/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
OPB14/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB15/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPB15/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPB15/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1

OPB18/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
OPB19/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPB19/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPB19/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPB19/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPB19/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPB19/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPB20/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPB20/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPB20/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPB20/4	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPB20/5	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPB20/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPB20/7	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPB20/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPB20/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
OPC01/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPC01/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPC01/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC01/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	
OPC01/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	
OPC01/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	
OPC01/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	
OPC02/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC02/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC02/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
OPC02/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
OPC02/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPC02/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC02/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	
OPC02/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	
OPC02/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
OPC04/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
OPC04/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
OPC04/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC04/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC04/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
OPC04/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC04/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPC04/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPC04/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPC04/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
OPC04/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	
OPC04/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	
OPC04/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	
OPC05/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPC05/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
OPC05/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC05/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	
OPC05/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
OPC05/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC05/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPC05/8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

OPC05/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC05/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1
OPC05/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC05/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC05/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC05/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	
OPC05/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	
OPC05/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	
OPC05/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC05/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC06/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC08/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPC08/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC08/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPC08/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPC08/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
OPC08/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1
OPC08/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1
OPC08/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
OPC10/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPC10/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPC10/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC10/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPC10/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
OPC10/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
OPC10/7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC10/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPC10/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0
OPC10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC10/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPC12/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC12/4	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC12/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC12/7	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC12/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPC12/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPC12/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPC12/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPC13/1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC13/2	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC13/3	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC13/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
OPC13/5	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPC13/6	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

OPD08/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD08/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD08/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPD08/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
OPD08/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD08/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0
OPD08/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
OPD10/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPD10/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0
OPD10/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD10/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPD12/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
OPD12/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
OPD12/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD12/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
OPD13/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPD13/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1
OPD13/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/8	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD13/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD13/10	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD13/11	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD13/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0
OPD13/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0
OPD13/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD13/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD14/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD14/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD14/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD14/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD14/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD15/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
OPD15/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

OPD15/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
OPD15/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0		
OPD15/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1		
OPD15/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1		
OPD15/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	
OPD15/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
OPD15/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0
OPD15/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD15/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
OPD15/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
OPD15/13	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
OPD18/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD18/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD18/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD18/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1
OPD20/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD20/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD20/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPD20/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
OPD20/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1

OPD20/19		0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
OPD20/20		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
OPD20/21		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPD20/22		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
OPD20/23		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
OPD20/24		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
OPD20/25		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0

Anexo 4.7.1: Matriz básica de marcadores AFLPs.

Las primeras dos cifras, de cada marcador, corresponden al iniciador *EcoR* I y las segundas al iniciador *Mse* I.

marcador	G10/3	G16186/16	G16/12I	G14/14a	G16183/14	G1/3b	D. Juan	Artasa	G1/3	G6/1	G1	G6	D. Arm.	G6/19	G10/13I	G2/1	G14	G2/1	G14	G6/2	D. Guiera	G14/4
3837/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/5	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/15	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/16	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/18	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/19	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/21	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/22	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/25	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/26	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3837/27	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
3837/28	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3837/29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/30	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/34	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3837/36	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/37	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3837/39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3837/40	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

3843/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3843/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3843/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3843/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3843/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/16	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/17	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/18	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3843/21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/24	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3843/25	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3843/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3843/27	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/30	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/32	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3843/36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/39	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/42	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/43	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3843/44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
3843/46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/47	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/48	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
3843/49	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/50	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/51	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/52	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/53	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
3843/54	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
3843/55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/56	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3843/57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3844/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	1
3844/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0

3844/57	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
3844/58	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
3844/61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/62	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/63	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/64	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/65	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/66	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/67	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/68	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3844/70	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/72	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/75	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/76	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/77	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3844/78	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/79	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/80	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/82	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3844/83	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/84	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3844/85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3845/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
3845/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
3845/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
3845/12	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3845/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
3845/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
3845/16	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3845/17	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0
3845/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
3845/19	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3845/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	0
3845/21	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3845/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0
3845/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
3845/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0

3846/58	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/59	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/60	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/61	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3846/62	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3844/63	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/64	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3846/65	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3846/66	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/67	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/68	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/69	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/70	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/72	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/73	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/74	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/75	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/76	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/77	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
3846/78	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1
3846/79	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3846/80	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3846/81	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3846/82	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3846/83	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3846/84	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3846/85	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/86	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/87	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3846/88	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3846/89	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
3846/90	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
3846/91	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0
3846/92	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/93	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3846/94	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1
3846/95	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/96	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/97	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3846/98	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1
3846/99	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0
3846/100	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
3846/101	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/102	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/103	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/104	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/105	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/106	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/107	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0
3846/108	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1
3846/109	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3846/110	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0

3846/164| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/165| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/166| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/167| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/168| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/169| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/170| 1 0 0 0 0 1 0 0 0 1 0 1 0 1 1 0 1 0 0 0
3846/171| 1
3846/172| 1
3846/173| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1
3846/174| 1
3846/175| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0
3846/176| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/177| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1
3846/178| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0
3846/179| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1
3846/180| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0
3846/181| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0
3846/182| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 1 1 1 1 1 1
3846/183| 1
3846/184| 1
3846/185| 1
3846/186| 1
3846/187| 1
3846/188| 1
3846/189| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0 0
3846/190| 1
3846/191| 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/192| 1
3846/193| 1
3846/194| 1
3846/195| 1
3846/196| 1
3846/197| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/198| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/199| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 1
3846/200| 0 1 1 1 1 0 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
3846/201| 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/202| 1 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/203| 1 1 1 1 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/204| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1
3846/205| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 1 1 1 1
3846/206| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 0 0 0 1 0 0 0
3846/207| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/208| 0 1 0 1 1 0 1 1 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/209| 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
3846/210| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 0 0 1 1 1
3846/211| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 0 0 0
3846/212| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0
3846/213| 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 1 0 0 1 1 1 1
3846/214| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 0 0 0 0 0 0
3846/215| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 1 1 1 1 1
3846/216| 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0

4135/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1
4135/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0
4135/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4135/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4135/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4135/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1
4135/20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4135/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4135/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
4135/24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4135/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4135/32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4135/40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4135/41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1
4137/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/2	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/3	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4137/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
4137/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4137/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4137/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4137/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
4137/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

4137/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0
4137/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/15	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/16	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4137/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
4137/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
4137/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/24	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
4137/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
4137/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/30	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4137/32	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/33	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/37	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4137/38	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/39	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4137/41	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4138/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
4138/2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
4138/3	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4138/4	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
4138/5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4138/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0
4138/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/9	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4138/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1
4138/12	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/13	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0
4138/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
4138/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
4138/17	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4138/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4138/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
4138/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4138/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4138/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

4144/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1
4144/2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4144/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4144/8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4144/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4144/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1
4144/15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
4144/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4144/20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4144/21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4144/22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/25	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4144/30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4144/31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1
4144/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0
4145/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1
4145/6	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
4145/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
4145/9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/10	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
4145/12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/15	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/17	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/18	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4145/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/21	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1

4145/22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
4145/23	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
4145/24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
4145/26	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/28	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/29	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4145/31	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4145/32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1
4145/33	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/34	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4145/35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/36	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/37	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/38	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/39	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
4145/40	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1
4145/41	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1
4145/42	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
4145/43	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/45	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/46	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4145/47	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
4146/9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
4146/10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
4146/11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/12	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/14	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/15	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/17	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0
4146/20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/21	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4146/24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/25	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1
4146/26	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4146/27	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

BIBLIOGRAFÍA

- Agong S.G. y P.O. Ayiecho, 1991.** The rate of outcrossing in grain amaranths. *Plant Breed.* 107:156-160.
- Andersen W.R. y D.J. Faribanks, 1990.** Molecular markers: Important tools for plant genetic resource characterization. *Diversity* 6:51-53.
- Behera B. y S.N. Patnaik, 1974.** Cytotaxonomic studies in the family Amaranthaceae. *Cytologia* 39:121-131.
- Behera B. y S.N. Patnaik, 1982.** Genome analysis of *Amaranthus dubius* Mart.ex.Thell. through the study of *A. spinosus* x *A. dubius* hybrids. *Cytologia* 47:379-389.
- Bhat K.V., R.L. Jarret y Z.W. Liu, 1994.** RFLP characterization of Indian *Musa* germplasm for clonal identification and classification. *Euphytica* 80:95-103.
- Bonamico N., M. Di Renzo, D. Puecher y J. Gesumaría, 1998.** Variabilidad isoenzimática en amarantos cultivados. Actas XVI Reunión Científica Anual de la Sociedad de Biología de Cuyo p. 90, Mendoza.
- Caetano-Anolles G., B.J. Bassam y P.M. Gresshoff, 1991.** DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary primers. *Bio/Technology* 9:553-557.
- Carlsson R., 1977.** *Amaranthus* species and related species for leaf protein concentrate production. Proceedings of the First Amaranth Seminar EUA.
- Casillas Gómez F.J., 1986.** Importancia de la semilla de Alegría. Primer Seminario Nacional de Amaranto. Chapingo, Méjico.
- Castiglione S., G. Wang, G. Damiani, C. Bandi, S. Bisoffi y F. Sala, 1993.** RAPD Fingerprints for identification and for taxonomic studies of elite poplar (*Populus spp.*) clones. *Theor. Appl. Genet.* 87:54-59.
- Cervantes J.M., 1986.** El amaranto como alimento para animales. Primer Seminario Nacional de Amaranto. Chapingo, Méjico.
- Coons M.P., 1982.** Relationships of *Amaranthus caudatus*. *Economic Botany* 36:129-146.
- Covas G., 1984.** Las especies de *Amaranthus* L. Amaranthaceae, nativas o naturalizadas en la Provincia de La Pampa. Apuntes para la flora de La Pampa pp. 333-341.

- Covas G., 1994a.** Fitomejoramiento de amarantos (*Amaranthus spp.*) para la región pampeana semiárida de la República Argentina. *Mendeliana* 11 (1):68-70.
- Covas G., 1994b.** Perspectivas del cultivo de los amarantos en la República Argentina. Publicación Miscelánea n°13. Estación Experimental Anguil, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. p.10.
- Crisci J.V. y M.F. Lopez Armengol, 1983.** Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica. OEA. Washington, D.C. Monografía n°26. Serie Biología. p.132.
- Chan K.F. y M. Sun, 1997.** Genetic diversity and relationships detected by isozyme and RAPD analysis of crop and wild species of *Amaranthus*. *Theor. Appl. Genet.* 95:865-873.
- Davis J.I., 1983.** Phenotypic plasticity and the selection of taxonomic characters in *Puccinellia* (Poaceae). *Syst. Bot.* 8:341-353.
- Demeke T., R.P. Adams y R. Chibbar, 1992.** Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 84:990-994.
- De Riek J., J. Dendauw, I. Roldán-Ruiz, V. Bockstaele y M. De Loose, 1997.** Identification strategy using RAPD and AFLP Belgian pot Azalea's. En: International union for the protection of new varieties of plants (UPOV). Working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular. Fourth session. BMT/4/7 pp.2-9. Cambridge, United Kingdom.
- Desai S.R., 1971.** Morphological and cytological studies on *Amaranthaceae*. *Cytologia* 36:349-353.
- Dice L.R., 1945.** Measures of the amount of ecologic association between species. *Ecology* 26:297-302.
- Dulson J., L.S. Kott y V.L. Ripley, 1998.** Efficacy of bulked DNA samples for RAPD DNA fingerprinting of genetically complex *Brassica napus* cultivars. *Euphytica* 102:65-70.
- Farris J.S., 1971.** The hypothesis of nonspecificity and taxonomic congruence, *Ann. Rev. Ecol.Syst.*, 2, 277.
- Fasheum A., 1986.** Photosynthetic efficiency of *Amaranthus hybridus* grown in the field. *Agricultural and Forest Meteorology.* 36.
- Feine L.B., 1986.** A provisional key to some edible species of the family *Amaranthaceae*. En: C.S. Kauffman and C. Reider (eds.), *Rodal amaranth germplasm collection.* p.68. Rodale Press, Emaus, P.A.
- Fjellstrom R.G. y D.E. Parffit, 1994.** Walnut (*Juglans spp.*) genetic diversity determined by restriction fragment length polymorphisms. *Genome* 37:690-670.
- Goodman M.M., C.W. Stuber, K. Newton y H.H. Weissinger, 1980.** Linkage relationships of 19 enzyme loci in maize. *Genetics* 96:697-710.

- Grant F.W., 1959a.** Cytogenetic studies in *Amaranthus* I. Cytogenetical aspects of sex determination in dioecious species. *Can. J. Bot.* 37:423-417.
- Grant F.W., 1959b.** Cytogenetic studies in *Amaranthus* II. Natural interspecific hybridization between *Amaranthus dubius* and *A. spinosus*. *Can. J. Bot.* 37:1063-1070.
- Grant F.W., 1959c.** Cytogenetic studies in *Amaranthus* III. Chromosome numbers and phylogenetic aspects. *Can. J. Genet. Cytol.* 1:313-318.
- Greizerstein E.J. y L. Poggio, 1992.** Estudios citogenéticos de seis híbridos interespecíficos de *Amaranthus* (Amaranthaceae). *Darwiniana* 31(1-4):159-165.
- Greizerstein E.J. y L. Poggio, 1994.** Kariological studies in grain amaranths. *Cytologia* 59:25-30.
- Grubben G.J.H. y D.H. van Sloten, 1981.** Genetic resources of amaranths. – A global plan of action. En: IBPGR Executive Secretariat, Plant Production and protection Division, Food and Agriculture Organization of the United Nations. International Board for Plant Genetic Resources pp.1-57.
- Guillin E., B.R. Baum B.R. y S. Mechanda, 1998.** Development of an identification scheme for Canadian registered oat cultivars using RAPDs. *Canadian Journal of Plant Science* 78 (4):605-610.
- Harris S.A., 1995.** Systematics and randomly amplified polymorphic DNA in the genus *Leucaena* (Leguminosae, Mimosoideae). *Pl. Syst. Evol.* 197:195-208.
- Hauptli H. y S.K. Jain, 1984.** Allozyme variation and evolutionary relationships of grain amaranths (*Amaranthus spp.*). *Theor. Appl. Genet.* 69:153-165.
- Hauptli H. y S. Jain, 1985.** Genetic variation in outcrossing rate and correlated floral traits in a population of grain amaranth (*Amaranthus cruentus* L.). *Genetics* 66:21-27.
- He G. y C.S. Prakash, 1997.** Identification of polymorphic DNA markers in cultivated peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Euphytica* 97:143-149.
- Hill M., H. Witsenboer, M. Zabeau, P. Vos, R. Kesseli y R. Michelmore, 1996.** PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca spp.* *Theor. Appl. Genet.* 93:1202-1210.
- Hoisington D., M. Khairallah y M. González-de-León, 1994.** Laboratory Protocols: CIMMYT Applied molecular genetics laboratory. Second edition. Mexico, D.F.: CIMMYT p. 2-3.
- Hunziker A.T., 1943.** Las especies alimenticias de *Amaranthus* y *Chenopodium* cultivadas por los indios de América. *Rev. Arg. Agron.* 10:297-355.
- Hunziker A.T., 1951.** El nombre botánico del "chaclion". *Revista Argent. Agron.* 18:104-106.
- Hunziker A.T., 1952.** Los pseudocereales de la agricultura indígena de América. p.104. Edit. Acme Agency, SRL. Buenos Aires.

- IBPGR, 1987.** International Board for Plant Genetic Resources, Annual Report 1986, Rome. p. 44.
- Irwin S.V., P. Kaufusi, K. Banks, R. De la Peña y J.J. Cho, 1998.** Molecular characterization of taro (*Colocasia esculenta*) using RAPD markers. *Euphytica* 99:183-189.
- Jaccard P., 1908.** Nouvelles recherches sur la distribution florale. *Bull. Soc. Vaud. Sci. Nat.* 44:223-270.
- Jain S.K., L. Wu y K.R. Vaidya, 1980.** Levels of morphological and allozyme variation in Indian amaranths: a striking contrast. *J. Hered.* 71:283-285.
- Jain S.K., H. Hauptli y K.R. Vaidya, 1982.** Outcrossing rate in grain amaranths. *J. Hered.* 73:71-72.
- Joshi C.P. y H.T. Nguyen, 1993.** Application of the random amplified polymorphism DNA technique for the detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheats. *Genome* 36:602-609.
- Karp A. y K.J. Edwards, 1995.** Molecular techniques in the analysis of the extent and distribution of genetic diversity. En: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. W. Ayad, W.G. Hodgkin, T.A. Jaradat y V.R. Rao (eds.), IPGRI. pp.11-22.
- Kauffman C.S., 1979.** Grain amaranth research: an approach to the development of new crop. *Proceedings of the second amaranth conference EUA*.
- Kauffman C.S. y L.E. Weber, 1990.** Grain amaranth. En: *Advances in new crops*. J. Janick y J.E. Simon (eds.), Timber Press, Portland, OR. pp. 127-139.
- Khoshoo T.N. y M. Pal, 1972.** Cytogenetic patterns in *Amaranthus*. *Chromosome Today* 3:259-267.
- Kongkiatngam P., M.J. Waterway, M.G. Fortin y B.E. Coulman, 1995.** Genetic variation within and between two cultivars of red clover (*Trifolium pratense* L.): Comparisons of morphological, isozyme, and RAPD markers. *Euphytica* 84:237-246.
- Lanaud C. y V. Lebot, 1995.** Molecular techniques for increased use of genetic resources. En: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources*. W.G.Ayad, T. Hodgkin, A. Jaradat y V.R. Rao (eds.), p. 92.
- Lanoué K.Z., P.G. Wolf, S. Browning y E.E. Hood, 1996.** Phylogenetic analysis of restriction-site variation in wild and cultivated *Amaranthus* species (Amaranthaceae). *Theor. Appl. Genet.* 93:722-732.
- Lin J.J. y J. Kuo, 1995.** AFLP: A novel PCR-based assay for plant and bacterial DNA fingerprinting. *Focus* 17, 2:66-70.
- Lin J.J., J. Kuo, J. Ma, A.A. Saunders, H.S. Beard, M.H. MacDonald, W. Kenworthy, G.N. Ude y B.F. Matthews, 1996.** Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA Mapping Techniques. *Plant Molecular Biology Reporter* 14, 2:156-169.

- Link W., C. Dixkens, M. Singh, M. Schwall y A.E. Melchinger, 1995.** Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germ plasm revealed by RAPD markers. *Theor. Appl. Genet.* 90:27-32.
- Maheswaran M., P. Subudhi, S. Nandi, J. Xu, A. Parco, D. Yang y N. Huang, 1997.** Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. Appl. Genet.* 94:39-45.
- Mickevich M.F., 1978.** Taxonomic congruence, *Sys. Zool.*, 27, 143.
- Nei M. y W.H. Li, 1979.** Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences (USA)* 76:5269-5273.
- Neumann G., M. Di Renzo y D. Puecher, 1994.** Variaciones ontogenéticas y genotípicas en *Amaranthus spp.* *Actas XXV Congreso Argentino de Genética III Jornadas Argentino - Uruguayas de Genética.* p. 13, La Plata.
- Newbury H.J. y B.V. Ford-Lloyd, 1993.** The use of RAPD for assesing variation in plants. *Plant Growth Regulation* 12:43-51.
- Nicese F.P., J.I. Hormaza y G.H. McGranahan, 1998.** Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. *Euphytica* 101:199-206.
- Nieto Cabrera C., 1989.** El cultivo de amaranto (*Amaranthus spp.*). Una alternativa agronómica para Ecuador. *Publicación Miscelánea n°52. Estación Experimental "Santa Catalina".* p.27.
- Nu-World Amaranth Inc., 1998.** Copyright © 1998.
- Pal M., 1972a.** Evolution and improvement of cultivated Amaranths. I. Breeding System and Inflorescence Structure. En: *Proceedings of the Indian National Science Academy.* vol.38, part B n°1 y 2 pp.28-37.
- Pal M., 1972b.** Evolution and improvement of cultivated Amaranths. III. *Amaranthus spinosus-dubius* Complex. *Genetica* 43:106-118
- Pal M. y T.N. Khoshoo, 1972.** Evolution and improvement of cultivated amaranths. V. Inviability, weakness, and sterility in hybrids. *J. Hered.* 64:78-82.
- Pal M. y T.N. Khoshoo, 1973a.** Evolution and improvement of cultivated Amaranths. VI. Cytogenetic relationships in grain types. *Theor. Appl. Genet.* 43:242-251.
- Pal M. y T.N. Khoshoo, 1973b.** Evolution and improvement of cultivated Amaranths. VII. Cytogenetic relationships in vegetable amaranths.. *Theor. Appl. Genet.* 43:343-350.
- Pal M. y T.N. Khoshoo, 1974.** Grain amaranths. En: *Evolutionary studies in world crops: diversity and charge in the Indian Subcontinent.* J.B. Hutchinson (ed.). pp. 129-137. Cambridge University Press, UK.
- Pal M. R.M., Pandley y T.N. Khoshoo, 1982.** Evolution and improvements of cultivated Amaranths IX. Cytogenetic relationships between the two basic chromosome numbers. *J. Hered.* 73:353-356.

- Palomino G. y R. Rubí, 1991.** Diferencias cromosómicas entre algunas especies y tipos del género *Amaranthus* distribuidos en México. Primer Congr. Intern. Amaranto (Oaxtepec, Morelos, México): 34.
- Paran I. y R.W. Michelmore, 1993.** Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Paran I., E. Aftergoot y C. Shifriss, 1998.** Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 99:167-173.
- Penner G., A. Bush, R. Wise, W. Kim, L. Domier, K. Kasha, A. Laroche, G. Scoles, S. Molnar y G. Fedak, 1993.** Reproducibility of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) Analysis among Laboratories. *PCR Methods and Applications* 2:341-345. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Piepho H.P. y F. Laidig, 1997.** A review of methods for cluster analysis of marker data. En: International union for the protection of new varieties of plants (UPOV). Working group on biochemical and molecular techniques and DNA-profiling in particular. Fourth session, BMT/4/7. pp.1-13. Cambridge, United Kingdom.
- Pigliucci M., M.G. Politi y D. Bellicampi, 1991.** Implications of phenotypic plasticity for numerical taxonomy of *Ornithogalum montanum* (Liliaceae). *Can. J. Bot.* 69:34-38.
- Powell W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey y A. Rafalski, 1996.** The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2:225-238.
- Quiros C.F., J. Hu, P. This, A.M. Chevre y M. Delseny, 1991.** Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 82:627-632.
- Ranade S.A., A. Kumar, M. Goswami, N. Farooqui y P.V. Sane, 1997.** Genome analysis of amaranths: Determination of inter- and intra-species variations. *J. Biosci.* 22, 4:457-464.
- Rangel E., 1986.** Situación actual y problemática del cultivo de amaranto en Méjico. Primer Seminario Nacional del Amaranto. Chapingo, Méjico.
- Rohlf F.J., 1998.** NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY.
- Rogers S.O. y A.J. Bendich, 1988.** Extraction of DNA from plant tissues. En: *Plant Molecular Biology Manual*. S.B. Gelvrin, R.A. Schiberoort y D.P. Verma (eds.), A6:1-10. Kluwer Academic Publishers, Belgium.
- Sauer J.D., 1950.** The grain amaranths: a survey of their history and classification. *Ann. Missouri Bot. Garden* 37:561-632.
- Sauer J.D., 1967.** The grain amaranths and their relatives: A revised taxonomic and geographic survey. *Ann. Missouri Bot. Gardens* 54:103-137.

- Sauer J.D., 1976.** Grain amaranths. En: Evolution of crop plants. Simmonds NW (ed.), pp.4-7. Longman Group Ltd. London.
- Singhal R.S. y P.R. Kulkarni, 1988.** Review: amaranths an underutilized resource. Int. J. Food Sci. Tech. 23:125-139.
- Skroch P., J. Tivang y J. Nienhuis, 1992.** Analysis of genetic relationships using RAPD marker data. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding 26-30.
- Smith J.S.C. y O.S. Smith, 1992.** Fingerprinting crop varieties. En: Advances in agronomy. vol. 47. pp.85-127. Academic Press, Inc.
- Sneath P.H.A. y R.R. Sokal, 1973.** Numerical taxonomy. W.H. Freeman and Company, San Francisco.
- Sokal R.R. y F.J. Rohlf, 1962.** The comparison of dendograms by objective methods, Taxon. 11, 33.
- Southern E.M., 1975.** Determination of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517.
- Sreelathakumary I. y K.V. Peter, 1993.** Amaranth, *Amaranthus spp.* En: Genetic improvement of vegetable crops. G. Kallao y B.O. Bergh (eds.), pp.315-323. Pergamon Press Ltd.
- Sun Q., N. Zhongfu, L. Zhiyong, J. Gao y T. Huang, 1998.** Genetic relationships and diversity among Tibetan wheat, common wheat and European spelt wheat revealed by RAPD markers. Euphytica 99:205-211.
- Tandon S.L. y M. Tawakley, 1970.** In IOPB chromosome number reports XXVI. Taxon. 19:264-269.
- Tanksley S.D. y T.J. Orton, 1983.** Isozymes in plant genetics and breeding (part B). p.472. Elsevier Science Publishers B.V. The Netherlands.
- Thormann C.E. y T.C. Osborn, 1992.** Use of RAPD and RFLP markers for germplasm evaluation. Applications of RAPD Technology to Plant Breeding 9-11.
- Tingey S.V. y J.P. del Tufo, 1993.** Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA markers. Plant Physiol. 101:349-352.
- Transue D.K., D.J. Fairbanks, L.R. Robison y W.R. Andersen, 1994.** Species identification by RAPD analysis of grain amaranth genetic resources. Crop Sci. 34:1385-1389.
- Trujillo T.R., 1986.** Requerimientos climáticos para el cultivo de Amarantho (*Amaranthus spp.*) en México. Primer Seminario Nacional de Amarantho. Chapingo, Méjico.
- UPOV/BMT/4/21, 1997.** Draft Report, prepared by the Officer of the Union. Fourth Session, Cambridge, United Kingdom.
- UPOV/QUI/96/15, 1996.** La noción de variedad esencialmente derivada.



53021