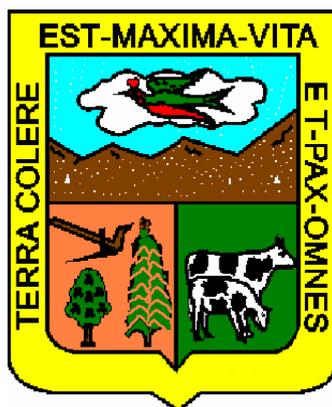


**UNIVERSIDAD NACIONAL HERMILIO VALDIZAN  
HUÁNUCO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA**



ESTUDIO DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE TARWI (*Lupinus mutabilis* Sweet) DE LA REGIÓN HUÁNUCO A TRAVÉS DEL USO DE MARCADORES MOLECULARES ISSR

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:  
INGENIERO AGRÓNOMO**

Arones Victorio, Alex

**HUÁNUCO - PERÚ**

2016

## **DEDICATORIA**

*A las dos mujeres más importantes de mi vida  
A mi madre y mi abuelita quienes me dieron el más valioso  
regalo que pudieron entregarme...  
Su gran amor, comprensión y apoyo para todas las cosas  
que he realizado en mi vida.*

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Programa de Cereales de la Universidad Nacional Agraria la Molina por darme la oportunidad de desarrollar mi tesis en su casa de estudios y además por la financiación del proyecto.

A la Dra Milka Tello Villavicencio por su confianza depositada en mí para el desarrollo de esta tesis y por su asesoramiento en el presente trabajo de tesis.

Al Dr. Jorge Jiménez Dávalos por su gran amistad, estima, apoyo y sugerencias en la realización del presente trabajo de investigación.

A las personas que hicieron posible realizar la colecta de las accesiones de tarwi en la Región de Huánuco.

A Yinna Taipe y Erick Rosales, primeros amigos en el programa que me ayudaron a reconocer y usar los instrumentos del laboratorio

A los practicantes de Biología, Daniel y Mariela por haber contribuido en este trabajo de investigación, al inicio y durante su desarrollo, en el tinglado y en las actividades del laboratorio.

Al amigo Joel N. Flores T. del Instituto de Biotecnología (IBT) por sus consejos en la realización del presente proyecto.

Al Tec. Luis Gutierrez W. del Centro Internacional de la Papa (CIP) por su apoyo incondicional con los programas e información de protocolos durante el desarrollo de esta tesis.

Al Mg Sc. Reynán Córdor A. un gran estadístico y fitomejorador, por su ayuda en el procesamiento de datos de esta investigación.

A Luz Y. Bernardo S., una gran amiga, por alentarme y su ayuda en el laboratorio.

Un especial agradecimiento a todos mis amigos del programa de cereales por su apoyo moral y buena amistad.

Finalmente mis gracias eternas a DIOS por permitirme seguir desarrollándome más, por su amor y por hacerme ver que en la vida hay muchos obstáculos pero jamás imposibles de transitar en ella.

## RESUMEN

El tarwi en el Perú es considerado como un recurso valioso para la seguridad alimentaria y la salud de la población, desde épocas incaicas, lo cual le ha revalorizado en estos últimos años, llegando a considerarse como un cultivo de potencial importancia frente al cambio climático.

En el presente trabajo de investigación un total de 137 accesiones de ***Lupinus mutabilis Sweet.***, de la colección del banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina (UNALM), provenientes de la región de Huánuco, fueron evaluados con los marcadores moleculares Intermicrosatélites (ISSR); con el fin de determinar el grado de polimorfismo que expresan los marcadores moleculares; identificar las accesiones duplicadas y su agrupación según características genotípicas; identificar los grupos que forman las acciones según provincias de colecta y determinar el nivel de variación genética entre las acciones colectadas.

Seis iniciadores fueron seleccionados para amplificar el ADN de las 137 accesiones en estudio, detectándose 213 loci. Estos iniciadores fueron altamente informativos con un contenido de información polimórfica promedio de 35,42%. De acuerdo a las accesiones y marcadores evaluados; la provincia de Huánuco y Ambo muestra mayor variabilidad genética, con un porcentaje de polimorfismo de 80,75% y 72,30% respectivamente, así mismo las accesiones de estas dos provincias se encuentran distribuidos en diferentes agrupaciones en el dendograma, mientras que la provincia de Dos de Mayo es la única que mantiene el 85% de sus accesiones en una misma agrupación. Estas ubicaciones de las accesiones de una misma provincia en distintas agrupaciones, se da porque el grado de diferenciación genética existente es grande ( $F_{st}$ : 0.19328) evidenciando que la mayor variación genética se da entre las accesiones dentro de los distritos.

## ÍNDICE DE CONTENIDOS

CONTENIDO	pág.
LISTA DE CUADROS.....	09
LISTA DE FIGURAS.....	11
LISTA DE ANEXOS.....	12
<b>I. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>13</b>
<b>II. MARCO TEÓRICO.....</b>	<b>15</b>
2.1. Fundamentación teórica.....	15
2.1.1. Posición taxonómica.....	15
2.1.2. Clasificación aspectos botánicos de la especie.....	15
2.1.3. Importancia.....	17
2.1.4. Origen, variabilidad y parientes silvestres.....	20
2.1.5. Adaptación.....	21
2.1.6. Marcadores moleculares.....	22
2.1.7. Marcadores moleculares intermicrosatélites.....	22
2.1.8. Extracción de ADN genómico.....	23
2.1.8.1. Generalidades.....	23
2.1.8.2. Cosecha del material vegetal y almacenamiento.....	24
2.1.8.3. Ruptura de tejidos y paredes celulares.....	25
2.1.8.4. Lisis de las membranas celulares y estabilidad del ADN.....	26
2.1.8.5. Descarte de restos celulares.....	29
2.1.8.6. Recuperación y limpieza del ADN.....	30
2.1.8.7. Resuspensión del pellet.....	30
2.1.8.8. Degradación del ARN.....	30
2.1.8.9. Método de extracción CTAB.....	31
2.1.9. Cuantificación y medida de la calidad del ADN.....	31
2.1.10. La PCR (Polymerase chain reaction).....	33
2.1.11. Separación de los fragmentos amplificados.....	37
2.1.11.1. Principios básicos de la electroforesis.....	37
2.1.11.2. Geles de agarosa y acrilamida.....	38
2.1.12. Análisis de datos.....	39

2.1.12.1. Aplicación de las técnicas numéricas.....	39
2.2. Antecedentes.....	45
2.3. Hipótesis.....	45
2.3.1. Hipótesis general.....	45
2.3.2. Hipótesis específicos.....	45
2.4. Variables y operacionalización de variables.....	45
<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>47</b>
3.1. Lugar de ejecución.....	47
3.2. Tipo y nivel de investigación.....	47
3.3. Población, muestra y unidad de análisis.....	47
3.4. Técnicas e Instrumentos de recolección y procesamiento de la información.....	48
3.5. Equipos y materiales.....	49
3.6. Conducción de la investigación.....	52
3.6.1. Siembra de accesiones en tinglado.....	52
3.6.2. Colección de material vegetal.....	52
3.6.3. Molido de las muestras secas.....	52
3.6.4. Extracción de ADN.....	53
3.6.5. Cuantificación y pureza.....	54
3.6.6. Calidad del ADN.....	55
3.6.7. Diluciones.....	56
3.6.8. Amplificación del ADN por medio de ISSR´s.....	56
3.6.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	58
3.6.10. Fijación, de geles con nitrato de plata.....	60
3.6.11. Recopilación de datos.....	62
3.6.12. Análisis de datos.....	62
<b>IV. RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
4.1. Análisis de Polimorfismo.....	66
4.1.1. Estimación del Índice de Contenido Polimórfico (PIC)..	66
4.1.2. Estimación del Porcentaje de Loci Polimórfico (P).....	67
4.2. Identificación de accesiones duplicadas y agrupaciones según características genotípicas.....	68
4.3. Identificación de grupos de accesiones según provincias	

de colecta.....	71
4.4. Análisis de varianza molecular.....	74
<b>V. DISCUSIÓN.....</b>	<b>76</b>
5.1. Análisis de Polimorfismo.....	76
5.1.1. Estimación del Índice de Contenido Polimórfico (PIC). 76	
5.1.2. Estimación del Porcentaje de Loci Polimórfico (P).....	77
5.2. Identificación de accesiones duplicadas y agrupaciones según características genóticas.....	79
5.3. Identificación de grupos de accesiones según provincias de colecta.....	81
5.4. Análisis de varianza molecular.....	83
<b>VI. CONCLUSIONES.....</b>	<b>84</b>
<b>VII. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>85</b>
<b>LITERATURA CITADA.....</b>	<b>86</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>92</b>

## LISTA DE CUADROS

Cuadro N°1: Producción y rendimiento mundial de lupino en el año 2009...	18
Cuadro N°2: Producción, superficie cosechada, rendimiento y precio en chacra a nivel nacional del tarwi en los años 2005- 2009.....	18
Cuadro N°3: Producción, superficie cosechada, rendimiento y precio en chacra del tarwi por departamento en el año 2009.....	19
Cuadro N°4: Cuadro Comparativo de marcadores Moleculares.....	23
Cuadro N°5: Principales componentes de un tampón de extracción.....	27
Cuadro N°6: Fundamentos, ventajas y desventajas de algunas técnicas para cuantificación de ADN.....	32
Cuadro N°7: Componentes de la reacción de PCR, características y rangos de concentración.....	36
Cuadro N°8: Rangos óptimos de separación en agarosa y acrilamida no denaturada.....	38
Cuadro N°9: Matriz básica de datos (MBD), donde Xnt corresponde al valor del carácter “n” para la OTU “t”.....	41
Cuadro N°10: Tipos de coeficientes de asociación, nombres, formulas, tipos de datos necesarios y valores máximos y mínimos de similitud.....	42
Cuadro N°11: Matriz de similitud entre OTU.....	43
Cuadro N°12: Equipos, materiales, insumos y reactivos utilizados en el tinglado.....	48
Cuadro N°13: Reactivos y materiales (herramientas y equipos) utilizados en cada fase del laboratorio.....	49
Cuadro N°14: Lista de iniciadores utilizados.....	56
Cuadro N°15: Protocolo de PCR para marcadores ISSR.....	56
Cuadro N°16: Perfil Térmico de la PCR para marcadores ISSR.....	57
Cuadro N°17: Representación de los componentes que definen una AMOVA.....	64
Cuadro N°18: Polimorfismo de productos de amplificación de las 137 accesiones de <i>L. mutabilis</i> Sweet.....	66
Cuadro N°19: Polimorfismo de loci polimórfico por provincias de las	

accesiones de <i>L. mutabilis</i> Sweet.....	66
Cuadro N°20: Agrupación de las accesiones según las Características genóticas a una similitud genética de 0.505 - Coeficiente de Jaccard.....	68
Cuadro N°21: Agrupación de las accesiones según las provincias de colecta.....	70
Cuadro N°22: Análisis Molecular de Variancia con tres componentes: grupo, población e individuos.....	73

## LISTA DE FIGURAS

Figura N°1: Análisis del ADN genómico extraído a partir de <i>Secale cereale</i> L.....	32
Figura N°2: Principio de la reacción en cadena de la Polimerasa.....	35
Figura N°3: Zonas de colecta de las 137 accesiones.....	47
Figura N°4: Dendograma de las 137 accesiones de tarwi a una similitud genética de 0.505 - Coeficiente de Jaccard.....	69
Figura N°5: Dendograma de similitud genética de las 137 accesiones de tarwi respecto a su Provincia.....	72

## LISTA DE ANEXOS

Anexo N°1: Datos de pasaporte de las 137 accesiones de tarwi de la región Huánuco del banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos – UNALM.....	91
Anexo N°2: Total de provincias, distritos y caseríos de colecta.....	97
Anexo N°3: Gel de calidad de ADN de 24 accesiones de <i>Lupinus mutabilis</i> S.....	98
Anexo N°4: Corrida electroforética en gel de poliacrilamida de las amplificaciones con el iniciador ISSR UCB 834 con 53 accesiones de tarwi.....	98
Anexo N°5: Preparación de reactivos para la fijación de geles con nitrato de plata.....	99
Anexo N°6: Siglas y términos utilizados.....	99
Anexo N°7: Imágenes de conducción y ejecución de la tesis.....	100

## I. INTRODUCCIÓN

El tarwi ha sido utilizado por miles de años encontrándose restos de estas semillas en las tumbas de Nazca (100-500 a.C), en cerámicas Tiawanaquenses (500-1000 d.C) con pinturas estilizadas de estas plantas en regiones altoandinas, incluso en la época colonial, la primera referencia proviene del padre Valverde quien, en una carta al rey de España en 1539, sugiere que se paguen los impuestos con este grano (Mujica, sf y Tapia & Fries, 2007).

El Lupino o chocho conocido así en el norte del Perú, Ecuador y Colombia, tarwi o tarhui en quechua en la parte central y sur del Perú (Tapia y Fries, 2007) ha sido considerado como un recurso valioso para la seguridad alimentaria y la salud de la población desde épocas incaicas o prehispánicas (I Congreso Internacional de la Quinoa y Granos Andinos, 2013).

Estos granos andinos se ha revalorizado, hasta tener colectas desde 1974 que se encuentran en Universidades y otras en instituciones de los departamentos de Ancash, Cajamarca, Cuzco, Junín, La libertad, Ayacucho (Camarena *et al.*, 2012). La intención es tener varios bancos de germoplasma, como la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco - Facultad de agronomía, donde se ha encontrado mayor cantidad de colectas y desarrollado investigaciones diversas como: fertilización, productividad y estudios de caracterización morfológica (Lescano, 1994)

En la actualidad los granos andinos como el caso de este pseudocereal se están desarrollando dentro de un contexto innovador, otorgándoles cualidades ventajosas como el alto contenido proteico y diferentes trabajos en mejoramiento vegetal (I Congreso Internacional de la Quinoa y Granos Andinos, 2013) además que el tarwi puede ser considerado como un cultivo de potencial importancia frente a los efectos del cambio climático y sus efectos conservadores para el suelo (Camarena *et al.*, 2012).

La supervivencia a largo plazo de una especie depende de la suficiente cantidad de diversidad genética, para mantener el potencial de responder a

nuevas presiones de selección que generan los cambios ambientales. Por lo tanto es importante y necesaria la cuantificación de la variación genética del germoplasma, asimismo la determinación de las relaciones genéticas para tomar decisiones en los programas de mejoramiento y conservación (Ponce, 2011).

Según el MINAGRI (2014), la superficie cultivada del tarwi al año 2013 fue de 9 806 hectáreas, con una producción total de 144 504 TM y un rendimiento promedio de 1,251 TM/ha, evidenciándose un incremento en el área cultivada en razón al año anterior. Los precios en chacra oscilan entre S/. 3.36 nuevos soles por kilogramo de grano crudo.

Valiéndonos de las técnicas de biología molecular disponibles hoy para la detección de variabilidad genética a nivel de secuencia de ADN, o para la detección del polimorfismo genético, que abrieron el camino del paradigma genético básico: donde Mendel fue el pionero, para el análisis genético directo de la variación de la secuencia de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998), se investigó a través de la técnica de marcadores moleculares con ISSR, basada en PCR (Eguiarte *et al.*, 2007), el estudio de variabilidad genética del tarwi.

La presente investigación tuvo como objetivo general caracterizar mediante marcadores intermicrosatelites (ISSR) la variabilidad genética de las accesiones de tarwi de la región de Huánuco, accesiones que actualmente son parte de la colección del germoplasma del Programa de cereales y Granos Nativos de la Universidad nacional Agraria la Molina (UNALM), cuyos objetivos específicos han sido:

1. Determinar el grado de polimorfismo de los marcadores moleculares en tarwi.
2. Identificar las accesiones duplicadas y agruparlas según las características genotípicas.
3. Identificar los grupos que forman las accesiones según las provincias de colecta.
4. Determinar el nivel de variación genética entre las accesiones colectadas.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Fundamentación teórica

#### 2.1.1. Posición taxonómica

Camarena *et al.* (2012) mencionan que la clasificación actual de la planta en estudio se muestra a continuación:

REINO Vegetal

DIVISIÓN Fenerógama

CLASE Dicotiledonea

ORDEN Fabales

FAMILIA Fabaceae

TRIBU Genisteas

GÉNERO *Lupinus*

ESPECIE *Lupinus mutabilis* Sweet

NOMBRE COMÚN Tarwi

#### 2.1.2. Clasificación de aspectos botánicos de la especie

Jacobsen y Mujica, citado por Zegarra (2010) destacan que el tarwi es una planta anual que crece desde los 1 500 msnm hasta 3 500 msnm, se desarrolla en valles templados y áreas alto-andinas; y es muy resistente al ataque de insectos.

Añade también que es una leguminosa herbácea erecta. Presenta una raíz pivotante profunda que puede extenderse hasta los 3 m de profundidad. Su tallo es robusto y leñoso, alcanzando una altura de 0,5 a 2 m. Sus hojas están compuestas generalmente por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados.

Camarena *et al.* (2012) describen las principales características que se presentan a continuación:

**Raíces y nódulos:** En la raíz se desarrolla un proceso de simbiosis con bacterias nitrificantes que forman nódulos de variados tamaños (1 a 3

cm). Indica que en suelos con presencia de bacterias, la formación de nódulos se inicia a partir del quinto día después de la germinación. Se encontró cepas de *Rhizobium lupini* con gran efectividad y su presencia en el eje central de la raíz estuvo altamente correlacionada con plantas más vigorosas y productivas.

**Hojas:** De forma digitada, generalmente compuesta por ocho folíolos que varían entre ovalados a lanceolados. En la base del pecíolo existen pequeñas hojas estipulares, muchas veces rudimentarias. El color puede variar de amarillo verdoso a verde oscuro, dependiendo del contenido de antocianina.

**Tallo:** El tallo es totalmente glabro, grueso, leñoso y ramificado; puede variar de color verde a gris castaño dependiendo del grado de leñosidad que alcance y en las especies silvestres es rojizo a morado. El tallo principal, puede ser prominente y no prominente; si emerge sobre sus ramas laterales, es un tallo prominente y si las ramas alcanzan su misma altura es un tallo no prominente

**Ramificación y floración:** El tallo, las ramas y el eje principal termina en una inflorescencia; bajo ésta y a partir de las yemas axilares, se generan ramas primarias o ejes de primer orden; éstas, son bastante productivas y originan un nuevo nivel de ramas a partir de yemas axilares ubicadas en sus últimas hojas. La inflorescencia es un racimo terminal con flores dispuestas en vértice. Cada inflorescencia, puede tener entre 20 a 80 flores en el caso de lupino blanco y entre cinco a 20 en el caso de lupino australiano.

**Flores:** Las flores del tarwi son grandes presentan una corola grande de 1 a 2 cm., con cinco pétalos, un estandarte, dos quillas y dos alas, las flores se unen al racimo a través de cortos pedicelos. Según el tipo de ramificación del tallo puede tener hasta tres floraciones sucesivas. En una sola planta puede haber hasta 1000 flores. Los colores más comunes son los tonos de azul claro a azul oscuro, e incluso el púrpura. Otros colores pero menos comunes son blanco, crema, amarillo y rosado.

**Fruto:** Mide entre 7 a 15 cm de largo y entre 1,5 a 2,5 cm de ancho; al estado de madurez es una vaina plana y se presenta agudizada en forma curva en los extremos. Además son pubescentes cuando están verdes y no presentan una dehiscencia marcada. La vaina contiene una a ocho semillas.

**Semillas:** De diferentes formas: redondas, ovaladas o casi cuadrangulares, su tamaño es de 0,5 a 1,5 cm, el número de semillas por vaina es de cinco a doce, un kilogramo tiene de 3 500 a 5 000 semillas. La variación en el tamaño de la semilla depende de las condiciones en que desarrolla el cultivo como del ecotipo.

La semilla está cubierta por un tegumento endurecido que puede llegar a ser hasta el 10% de su peso total. Los granos son de color variado: blancos, amarillos, grises, Ocre, pardos, Castaños, marrones; así como, combinaciones de éstos como marmoleado, media luna, ceja y salpicado.

### 2.1.3. Importancia

Camarena *et al.* (2012) recalcan que *Lupinus spp.*, es un género globalmente importante y el *Lupinus mutabilis* Sweet originado en el área Andina de Sud Americano, es el único miembro Americano del género *Lupinus* que ha sido domesticado y cultivado.

Enfatiza también que a nivel mundial, la superficie cosechada de tarwi ha ido en descenso en los últimos años, llegando a 687 mil hectáreas en el 2009, el menor nivel registrado desde 1983. La producción se ha comportado de un modo distinto, presentando grandes fluctuaciones, resultado de variaciones en los rendimientos ocasionadas principalmente por factores climáticos adversos.

La producción mundial de lupino, como se aprecia en la **Cuadro N°1**, ha estado liderada históricamente por Australia; con una participación de 66% para el 2009, seguida por Bielorrusia que corresponde a una participación de 8% y Alemania con 7%, de acuerdo

a las estimaciones realizadas por ABARES (Australian Bureau of Agricultural and Resource Economics and Sciences); mientras que en el Perú, el tarwi Lupino amargo tiene una producción de 10 251 TM, con un rendimiento de grano de 1 102 kg/ha para el año 2009 (**Cuadro N°1**), el cual es menor que los registros para el lupino dulce.

**Cuadro N°1:** Producción y rendimiento mundial de lupino en el año 2009

País	Producción (t)	Rendimiento (kg/ha)
Argentina		1361,9
Australia	614 000	1271,2
Austria	621	3000,0
Bielorrusia	73 708	1875,2
Chile	12 311	1191,2
Ecuador	1220	345,9
Egipto	2881	1943,9
Francia	8321	2582,8
Alemania	69 627	3079,9
Grecia	700	2333,3
Hungría	556	1444,1
Italia	5000	1724,1
Libano	770	1954,3
Lituania	10 600	1019,2
Moroco	6612	240,6
<b>Perú</b>	<b>9907</b>	<b>1177,1</b>
Polonia	57 000	1596,6
Rusia	9290	1238,6
Slovakia	120	2448,9
Sudáfrica	20 654	1831,6
España	4700	691,1
Suiza	200	3225,8
Siria	15	1071,4
Ucrania	26 800	1604,7
<b>Total</b>	<b>925 412</b>	
<b>Promedio</b>		<b>1 346,2</b>

Fuente: [http://www.comunidadandina.org/desarrollo/Doc\\_base\\_taller3.pdf](http://www.comunidadandina.org/desarrollo/Doc_base_taller3.pdf) ...

Según el MINAG (2011) hay un incremento en producción, superficie cosechada, rendimiento de grano seco y se mejoran los precios del grano de tarwi en chacra del año 2006 al año 2009. La producción varió de 9 480 TM producidas en el año 2005 a 10 251 TM en el 2009 y la superficie se incrementó de 8 712 en el año 2005 a 9 302 has en el año 2009 (**Cuadro N°2**) y en la **Cuadro N°3**, se aprecia que para año 2009, como sobresalen en superficie cosechada, los departamentos del Perú.

**Cuadro N°2:** Producción, superficie cosechada, rendimiento y precio en chacra a nivel nacional del tarwi en los años 2005- 2009

<b>Años</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Superficie cosechada (t/ha)</b>	<b>Rendimiento (kg/ha)</b>	<b>Precio en chacra (S./kg)</b>
2005	9480	8712	1088	1,28
2006	8243	7468	1104	1,24
2007	8461	7476	1132	1,40
2008	8609	8048	1070	1,89
2009	10 251	9302	1102	2,66

Fuente: Ministerio de Agricultura, 2011

**Cuadro N°3:** Producción, superficie cosechada, rendimiento y precio en chacra del tarwi por departamento en el año 2009

<b>Departamentos</b>	<b>Producción (t)</b>	<b>Superficie cosechada (ha)</b>	<b>Rendimiento en grano (kg/ha)</b>	<b>Precio chacra (S./kg)</b>
La Libertad	3820	3351	1140	3,40
Cuzco	1921	1848	1039	1,91
Puno	1680	1381	1217	1,97
Ancash	827	838	987	3,25
Huánuco	549	450	1219	2,35
Apurímac	468	374	1252	1,79
Cajamarca	383	477	802	3,06
Huancavelica	352	289	1219	2,57
Ayacucho	139	114	1219	1,93
Amazonas	98	164	601	1,51
Junín	14	16	881	1,49
<b>Total</b>	<b>10 251</b>	<b>9302</b>		

Fuente: Ministerio de Agricultura, 2011.

Los bajos rendimientos expresados anteriormente, se deben a la presencia de factores bióticos y abióticos tales como pestes, heladas y terrenos accidentados o marginales, falta de ecotipos de buen rendimiento y el largo período vegetativo, por lo que el tarwi no ha alcanzado la categoría de cultivo principal.

En los últimos años se redescubrió su potencial nutritivo y cobró vigencia en el mercado mundial. En el 2008 el Perú ha exportado US\$ 6 155 FOB, un peso neto de 1 833 kg a España, Estados Unidos y Países Bajos con presentaciones de tarwi en harina, tarwi extruído, chochos granos o chayotes y harina power. Las harinas son usadas en alimentación animal y en acuicultura y en la actualidad estos volúmenes

son mayores. Sin embargo, el tarwi tiene relevancia desde la época prehispánica, por su elevado valor proteico, cantidad de aminoácidos esenciales y grasas así como el alto valor de vitaminas A, complejo B, hierro, calcio y fósforo

#### **2.1.4. Origen, variabilidad y parientes silvestres**

Jacobsen y Mujica, citado por Zegarra (2010) y Mujica (s.f) concuerdan que el tarwi es una leguminosa que ha sido cultivada en el área andina desde épocas preincaicas, originaria de los Andes de Bolivia, Ecuador y Perú ya que en ella se encuentra la mayor variabilidad genética. En esa región se han identificado 83 especies del género *Lupinus*. Las variedades y cultivares conocidos son numerosos; en el Perú, Andenes 80, Cuzco, Kayra, Caarlos Ochoa, Yunguyo, Altagracia, H6, SCG-9, SCG-25, SLP-1, SLP-2, SLP-3, SLP-4, SLP-5; en Bolivia: Toralapa y Carabuco; en Chile, Inti; además Mujica (s.f) destaca que el tarwi muestra amplia diversidad genética, con gran variabilidad en la arquitectura de la planta, adaptación a suelos, precipitación, temperatura y altura; asimismo en precocidad, contenido de proteínas, aceite, alcaloides y en rendimiento y tolerancia a enfermedades. El color del grano, planta y flor es variable.

Eastwood *et al.*, citado por Sota (2012) menciona que las especies que hoy en día se distribuyen en América (con exclusión de las especies unifolioladas de Florida) se agrupan en dos clados: El del este de América del sur ( $2n= 36$ ) y el del oeste de América del Sur ( $2n= 48$ ).

Estrada, Medina y Roldán (2006) refieren que la diversidad son todas las variaciones genéticas, producto de la diferencia de las especies. Las especies pueden ser más o menos diversas; las características dentro de las poblaciones pueden ser más o menos variables. La variabilidad genética se aplica a las características.

Acotan también que los individuos de una especie difieren entre sí en muchas características. Esas diferencias tienen causas genéticas y

ambientales. Toda la variabilidad genética se origina por mutación. En su concepto más simple la mutación se produce por un cambio en un nucleótido en el sector de la cadena de ADN que codifica a un gen.

Gross y Tapia, citado por Camarena *et al.* (2012) indican que es una planta que presenta gran variabilidad morfológica y de adaptación ecológica en los Andes, por lo cual se ha sugerido que puede incluirse a tres subespecies:

- *Lupinus mutabilis*, chocho (norte de Perú y Ecuador), de mayor ramificación, muy tardío, mayor pilosidad en hojas y tallos, algunos ecotipos se comportan como bianuales, tolerantes a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tarwi (centro y sur de Perú), de escasa ramificación, medianamente tardío, algo tolerante a la antracnosis.
- *Lupinus mutabilis*, tauri (altiplano de Perú y Bolivia), de menor tamaño (1-1,40 m) con un tallo principal desarrollado, muy precoz, susceptible a la antracnosis.

Tapia, citado por Camarena *et al.* (2012) menciona que Las principales áreas de diversidad genética de especies cultivadas o silvestres que requieren ser recolectadas, se ubican por encima de los 3800 msnm y que su distinción entre plantas silvestres y domesticadas no es fácil.

EL MINAG (2011) indica que los parientes silvestres son todas aquellas especies del mismo género de los cultivos nativos que se encuentran en el mismo entorno ecológico y cultural. Son especies de las que fueron seleccionadas las plantas cultivadas (ancestros) u otras especies relacionadas estrechamente con estas.

### **2.1.5. Adaptación**

Tapia y Fries, citado por Camarena *et al.* (2012) dan a conocer que en el Perú, las plántulas de *Lupinus mutabilis* son susceptibles a las heladas, pero que sin embargo; se pueden encontrar campos con tarwi en zonas con incidencias de heladas como son los alrededores

del lago Titicaca (Yunguyo) donde se presentan temperaturas debajo de - 4 °C al final de la época de floración; probablemente, las plantas resisten por la fuerte incidencia termorreguladora del lago. Los autores también mencionan que las diferencias de temperatura entre el día y la noche, muy características de la zona alto andina, se incrementan al final del período de crecimiento y estas condiciones ambientales favorecen la acumulación de grasa. Sin embargo, las heladas antes de la maduración del grano lo afectan presentando una gran mayoría de granos chupados, con una significativa reducción de los rendimientos. Las heladas atrasan también la floración y otro factor ambiental desfavorable son las granizadas que pueden provocar un aborto de las flores y dañar las vainas.

De acuerdo a la clasificación que hace Pulgar, citado por Camarena *et al.* (2012), el tarwi se cultiva en las regiones Quechua (2300 a 3 500 msnm) y la región Suni o Jalca de los 3 500 a 4 000 msnm donde el clima es frío, húmedo y nublado y según Brack, citado por Camarena *et al.* (2012) el lupino o tarwi prospera en las ecorregiones de la Serranía Esteparia y la Puna.

#### **2.1.6. Marcadores moleculares**

EL INTA (2010) sustenta que un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida.

#### **2.1.7. Marcadores moleculares Intermicrosatélites**

Eguiarte *et al.*, (2007) indican que los ISSRs son un tipo de marcador genético que nos permite obtener los niveles de variación en las regiones microsatélite que se encuentran dispersas en varios genomas, particularmente el nuclear. Estas regiones consisten en repeticiones en tandem de motivos simples como (CT)<sub>n</sub> ó (CA)<sub>n</sub>, ubicadas entre secuencias no repetitivas del genoma nuclear eucarionte.

Los motivos repetidos, llamados también SSRs (simple sequence repeats) pueden ser penta-, tetra-, tri- y dinucleótidos.

Agregan también que los ISSRs son marcadores semiarbitrarios amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a partir de la presencia de un oligonucleótido o iniciador complementario a un microsatélite, diseñado para unirse a los motivos repetidos de di y trinucleótidos (evitando los mononucleótidos presentes en el cloroplasto). Los iniciadores de ISSRs consisten en un motivo repetido de di- o trinucleótidos complementario a la secuencia del microsatélite, además de ello es confiable y altamente reproducible, una poderosa herramienta para la investigación de la variación genética entre especies, tiene alto polimorfismo, bajo costo comparado con otras técnicas (Ver **Cuadro N°4**) y puede desarrollarse en cualquier especie sin la necesidad de requerir información previa de las secuencias genómicas.

**Cuadro N°4:** Cuadro Comparativo de marcadores Moleculares

Marcador/ Técnica	Basados en PCR	Polimorfismo (abundancia)	Dominancia	Repro - ducibilidad	Auto - matización	Costo
RFLP	No	Bajo/Medio	Codominante	Alto	Bajo	Medio
RAPD	Sí	Medio/Alto	Dominante	Bajo	Medium	Bajo
SCARS/CAPS	Sí	Alto	Codominante	Alto	Medio	Medio
AFLP	Sí	Alto	Dominante	Alto	Medio/Alto	Medio
SSR	Sí	Alto	Codominante	Alto	Medio/Alto	Alto
ISSR	Sí	Alto	Dominante	Ato	Medio/Alto	Bajo
SNP	Sí	Muy Alto	Codominante/ Dominante	Alto	Alto	Muy Alto

Fuente: Muchugi *et al.*, (2008), INTA (2010) y Eguiarte *et al.*, (2007).

## 2.1.8. Extracción de ADN genómico

### 2.1.8.1. Generalidades

Weising *et al.* (2005), Novaes *et al.* (2009), Joshi *et al.* (2010) y Colosi (1993) concuerdan que existen muchos métodos de extracción

de ADN, cada uno de ellos están modificados para la extracción eficaz de esta molécula a partir de una especie en particular. Esto debido a que aún en especies emparentadas la composición bioquímica es considerablemente variable y por tanto, el uso de un mismo protocolo en diferentes especies o aún en diferentes órganos de una misma especie (semillas, raíces, tallos, hojas, etc.) no garantiza un buen rendimiento de ADN puro e íntegro necesario para la posterior aplicación de las técnicas genéticas.

Hameed *et al.* (2004) sostienen que el éxito de un protocolo de extracción es medido según el rendimiento de ADN íntegro y de calidad, por tanto útil en estudios posteriores

Khanuja *et al.* (1999) mencionan que la extracción de ADN es dificultosa en una gran variedad de plantas. Esto debido a la presencia de metabolitos secundarios (aceites esenciales, alcaloides, flavonoides, fenoles, polisacáridos, terpenos y quinonas) que no solo interfiere en el mismo proceso de aislamiento sino que también afectan las posteriores reacciones de restricción, amplificación y clonación.

Weising *et al.* (2005) afirman que algunos de los problemas encontrados durante el aislamiento y purificación del ADN son: la degradación del ADN por endonucleasas, el co-aislamiento de polisacáridos y otros compuestos inhibitorios, como fenoles, que interfieren directa o indirectamente en las posteriores reacciones enzimáticas, el co-aislamiento de ácidos orgánicos, polifenoles, látex y otros compuestos secundarios que puedan causar daño al ADN y/o inhibir reacciones enzimáticas.

Khanuja *et al.* (1999) y Weising *et al.* (2005) coinciden que esta situación de los problemas durante el aislamiento y purificación se ve agravada al trabajar con especies que producen gran cantidad de metabolitos secundarios, como son la gran mayoría de plantas usadas en la industria.

### **2.1.8.2. Cosecha del material vegetal y almacenamiento**

Ferreira y Grattapaglia (1998) y Matayoh *et al.* (2008) añaden que una de las primeras consideraciones para la extracción de ADN de plantas es la manera como se colecta y almacena el tejido vegetal pues, la calidad y rendimiento del ADN extraído está afectado por la condición del tejido antes de la extracción.

Joshi *et al.* (2010) y Khanuja *et al.* (1999) detallan que la mayoría de protocolos recomiendan el uso de material vegetal fresco y en fase activa de crecimiento debido a que este tipo de tejido acumula menos polisacáridos; Sin embargo, el material vegetal puede provenir de lugares lejanos y por tanto requerirá ser almacenado.

Ferreira y Grattapaglia (1998) señalan que la conservación de la muestra colectada dependerá del tiempo que se encuentre almacenada. Para días de almacenamiento, el material vegetal puede ser colocado en un frigorífico o en hielo; si este es almacenado por más de una semana debe conservarse a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Para tiempos indefinidos de conservación se recomienda el almacenamiento a  $-60^{\circ}\text{C}$  o la liofilización del material.

### **2.1.8.3. Ruptura de tejidos y paredes celulares**

Weising *et al.* (2005) consideran que en la mayoría de los protocolos de aislamiento de ADN, el material vegetal es congelado en nitrógeno líquido y posteriormente molido, con un mortero, hasta obtener un polvo fino

Colosi y Schaal (1993) y Weising *et al.* (2005) mencionan que para el aislamiento de ADN a partir de poco tejido vegetal, la molienda puede ser realizada dentro del tubo de extracción utilizando un tip, pequeños morteros de mano o pequeñas billas de metal.

Colosi y Schaal (1993) citan que en general la molienda dentro de los tubos de extracción previene la contaminación de la muestra por ADN endógeno ya que, el material de molienda es utilizado

una sola vez; con excepción de las billas de metal que pueden reutilizarse luego de ser lavadas y autoclavadas

Aljanabi *et al.* (1999) denotan que algunas limitaciones del uso de nitrógeno líquido son: el costo del nitrógeno líquido y el cuidado que se debe tener para que el material vegetal no se descongele antes de agregar el tampón de extracción.

Weising *et al.* (2005) acotan que de otro modo, las enzimas liberadas durante el proceso degradarían el ADN. El uso de muestras liofilizadas o secas evita el problema del deshielo.

Matasyoh *et al.* (2008) enfatizan que el secado del material vegetal puede realizarse utilizando silica gel. En sus ensayos, el mismo autor, encontró buen rendimiento y calidad de ADN a partir de hojas de *Ocimum gratissimum* L. secadas en silica gel.

Weising *et al.* (2005) añade que si se utiliza material vegetal fibroso, la molienda puede ser facilitada con el uso de arena esterilizada o el pre corte del material. Por otro lado, el tejido fresco puede ser molido directamente en el tampón de extracción siempre y cuando se garantice que este tampón deja las organelas intactas. De otro modo, el ADN podría sufrir ruptura mecánica, además menciona que otros autores utilizan compuestos químicos que disuelven la pared celular. Un ejemplo, son las sales de potasio o sodio de etil xantogenato también utilizadas en la industria textil para la disolución de la celulosa.

#### **2.1.8.4. Lisis de las membranas celulares y estabilidad del ADN**

Weising *et al.* (2005) manifiestan que en la mayoría de los protocolos de extracción la lisis de las membranas y la liberación del ADN del núcleo, cloroplastos y mitocondria se realiza inmediatamente después de la molienda de las muestras.

Para este paso se hace uso del tampón de extracción. Este contiene compuestos que ayudan a la lisis de las membranas

(celulares o de las organelas) así como a la protección del ADN ya que, impiden la acción de enzimas nativas o compuestos secundarios liberados durante el proceso de purificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Según Weising *et al.* (2005), el tampón de extracción generalmente e consta de cinco componentes (**Cuadro N°5**). Estos varían en combinaciones y concentraciones dependiendo del tipo de tejido y especie en estudio (Ferreira y Grattapaglia, 1998, Hameed *et al.*, 2004, Weising *et al.*, 2005 y Novaes *et al.*, 2009).

**Cuadro N°5:** Principales componentes de un tampón de extracción.

Componentes	Usos	Rangos o concentraciones estándar
Detergente	<ul style="list-style-type: none"> <li>Solubilización de las membranas celulares (Ferreira &amp; Grattapaglia, 1998), desnaturalización de proteínas y disociación de proteínas del ADN (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> <li>Los detergentes más utilizados son: CTAB (detergente catiónico), sarkosyl y SDS (detergente aniónico) (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>	2% CTAB (Bromuro de Hexadecil Trimetil Amonio) y 1% de SDS (Sodio Dodecil Sulfato) (Weising <i>et al.</i> , 2005).
Tampón del sistema	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mantener el pH del tampón de extracción constante, evitando el pH óptimo de enzimas degradativas como las DNAsas (Ferreira &amp; Grattapaglia, 1998).</li> <li>El tampón más utilizado es el Tris-HCl pH 8.0 (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>	El rango de pH utilizado en los tampones de extracción fluctúa entre 8 y 9 (Ferreira & Grattapaglia, 1998 y Weising <i>et al.</i> , 2005).
NaCl	<ul style="list-style-type: none"> <li>Ayuda a la disociación de proteínas (especialmente histonas) del ADN (Weising <i>et al.</i>, 2005) e incrementa la solubilidad de los polisacáridos en presencia de etanol (Matasyoh <i>et al.</i>, 2008)</li> </ul>	>1 M NaCl (Weising <i>et al.</i> , 2005).
Agente reductor	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe procesos de oxidación que directa o indirectamente dañan al ADN (Matasyoh <i>et al.</i>, 2008). Además, inhiben DNAsas (Mansilla, 2001).</li> <li>Algunos agentes reductores son: β-mercaptoetanol, ácido ascórbico y el DTT Ditiotreitól (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>	>0.03% β-mercaptoetanol (Weising <i>et al.</i> , 2005).
Agente quelante	<ul style="list-style-type: none"> <li>Inhibe enzimas dependientes de metales ya que, captura iones metálicos bivalentes (Ferreira &amp; Grattapaglia, 1998).</li> <li>Algunos agentes quelantes son: EDTA (ácido etilen diamino tetra acético) y EGTA (ácido etilen glicol tetra acético) (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>	-

A continuación se detalla la importancia de la acción de los componentes del tampón de extracción:

#### **a. Remoción de proteínas**

La disociación de las proteínas (especialmente histonas) del ADN es propiciada por las altas concentraciones de NaCl y el detergente que se encuentra en el tampón (Weising *et al.*, 2005). Según Ferreira y Grattapaglia (1998), el uso del detergente CTAB en presencia de NaCl permite la precipitación selectiva del ADN. Además, estos mismos autores señalan que el uso del NaCl ayuda a precipitar el ADN en presencia de alcohol.

#### **b. Remoción de polifenoles**

Khanuja *et al.* (1999), Joshi *et al.* (2010), Ginwal y Singh (2010) mencionan que como se mencionó anteriormente, existe un gran número de metabolitos secundarios producidos por las plantas. Algunos de estos metabolitos son los fenoles y polifenoles que durante el proceso de extracción de ADN se oxidan y se unen de forma irreversible con proteínas y ácidos nucleicos. El material gelatinoso producido por la oxidación de los fenoles no podrá ser utilizado para posteriores reacciones de restricción y PCR.

Weising *et al.* (2005) indican que la influencia negativa de los polifenoles puede ser evitada utilizando una de las siguientes estrategias:

1. Uso de adsorbentes de polifenoles como el suero bovino o PVP (Polivinilpirrolidona) en la solución del tampón.
2. Uso de inhibidores de la fenoloxidasas como DIECA (ácido dietilditiocarbamato).
3. Uso de agentes antioxidantes como el  $\beta$ -mercaptoetanol.
4. Altos volúmenes de tampón de extracción con respecto a los gramos de muestra. Esto permitirá la dilución de los polifenoles y por tanto disminuirá sus efectos perjudiciales.

### **c. Remoción de polisacáridos**

Joshi *et al.* (2010), Ginwal y Singh (2010) y Matasyoh *et al.* (2008) sostienen que los polisacáridos inhiben la actividad de enzimas comúnmente utilizadas en biología molecular, tales son: Taq polimerasa, ligasas y endonucleasas. Esto se debe a la formación del complejo polisacáridos-ácidos nucleicos y su posterior precipitación durante el lavado con alcohol. La formación de este pellet gelatinoso (Matasyoh *et al.*, 2008) puede evitarse mediante las siguientes estrategias:

1. Aumento de la concentración del detergente CTAB en el tampón de extracción (Weising *et al.*, 2005).
2. Incremento de los niveles de NaCl (Khanuja *et al.*, 1999) para acrecentar la solubilidad de los polisacáridos en etanol y por tanto, evitar su co-precipitación con el ADN (Matasyoh *et al.*, 2008).

### **d. Inhibición de la actividad enzimática de las endonucleasas**

En general, los tampones de extracción de ADN contienen EDTA (Weising *et al.*, 2005). Este compuesto se une a iones de magnesio bivalente que son cofactores de la mayoría de endonucleasas y por tanto, previene su activación (Ferreira y Grattapaglia, 1998 y Puchooa, 2004). Sin embargo, en algunas especies de trigo y maíz se ha evidenciado que el EDTA estimula la acción de las endonucleasas (Hameed *et al.*, 2004).

#### **2.1.8.5. Descarte de restos celulares**

Mansilla (2001) y Weising *et al.* (2005) revelan que el primer paso para el descarte de los restos celulares es la extracción con un solvente orgánico. Entre los solventes orgánicos más usados encontramos al alcohol isoamílico, cloroformo y fenol. Los cuales, pueden ser utilizados de manera conjunta o en parejas.

El fenol es un eficaz desnaturalizante de proteínas mientras que, el cloroformo no solo desnaturaliza proteínas sino que también ayuda a la remoción de lípidos (Mansilla, 2001), clorofila y pigmentos (Joshi

*et. al.*, 2010). Durante esta etapa, se produce una cierta cantidad de espuma que es eliminada utilizando alcohol isoamílico (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Según Weising *et al.* (2005) posteriormente se realiza un proceso de centrifugación que separa la suspensión en dos fases. La fase superior o fase acuosa contiene el ADN, ARN y algunos restos de polisacáridos mientras que, la fase inferior u orgánica contiene las proteínas, lípidos y la mayoría de polisacáridos (Ferreira y Grattapaglia, 1998). Esta última fase debe ser descartada durante el proceso de extracción.

#### **2.1.8.6. Recuperación y limpieza del ADN**

Mansilla (2001) sostiene que es necesario eliminar los restos de polisacáridos y otros compuestos propios del proceso de extracción que se encuentran en la fase acuosa previamente recuperada. Para ello, se somete a esta fase a sucesivos lavados con etanol.

Ferreira y Grattapaglia (1998) sostienen que el etanol ayuda en la remoción de proteínas, sales y nucleótidos libres. La visualización del pellet de ácidos nucleicos (ADN y ARN) se realiza en esta etapa y es propiciado por la presencia del NaCl y etanol. Para recuperar este pellet se realiza una centrifugación después de cada lavado con etanol y posteriormente la muestra es decantada.

#### **2.1.8.7. Resuspensión del pellet**

Ferreira y Grattapaglia (1998) recalcan que luego de los lavados con alcohol, el pellet sedimentado se deja secar y posteriormente es resuspendido en buffer Tris-EDTA que ayuda a mantener su integridad.

#### **2.1.8.8. Degradación del ARN**

Weising *et al.* (2005) y Joshi *et al.* (2010) indican que el ARN a menudo es co-purificado con el ADN y puede causar problemas durante las reacciones de amplificación. Esta molécula, es usualmente

degradada utilizando RNAsas o mediante su precipitación selectiva con cloruro de litio. Cualquiera de estos tratamientos, puede ser realizado en las últimas etapas de la extracción.

Joshi *et al.* (2010) manifiesta que los nucleósidos liberados por la degradación del ARN no contaminan el ADN y por tanto, no interfieren en los procesos posteriores.

#### **2.1.8.9. Método de extracción CTAB**

Weising *et al.* (2005), Ferreira y Grattapaglia (1998) afirman que una de las estrategias de extracción más ampliamente utilizadas para el aislamiento de ADN a partir de material vegetal es el método CTAB. Denominado de esta manera por utilizar el detergente catiónico CTAB (Hexadecil Trimetil Amonium Bromide) en el tampón de extracción.

Ferreira y Grattapaglia (1998) revelan que este método ha sido acondicionado para una gran variedad de especies vegetales y tiene como una de sus principales características el ser adaptable a diferentes tipos de tejidos vegetales tales como: raíces, semillas, embriones, endosperma, hojas, polen, etc

#### **2.1.9. Cuantificación y medida de la calidad del ADN**

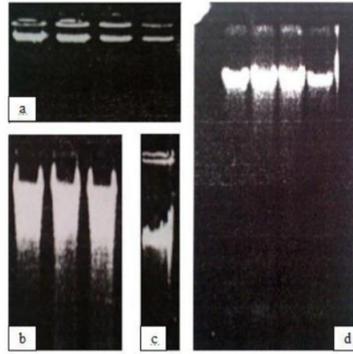
Karp *et al.* (1998) dice que La cuantificación del ADN extraído es un paso muy importante para posteriores reacciones de amplificación, uso de enzimas de restricción, etc. En esta etapa, los tres procedimientos más difundidos son: el uso del espectrofotómetro, la comparación de alícuotas de ADN extraído con ADN estándar en geles de electroforesis y el uso del fluorímetro (Ferreira y Grattapaglia, 1998 y Weising *et al.*, 2005). El fundamento de estos procedimientos y sus desventajas se comentan en el **Cuadro N° 6**.

Por otro lado, la visualización de la integridad del ADN (calidad del ADN) se realiza utilizando geles de agarosa en el rango de 0.7 a 1% (Karp *et al.*, 1998 y Khanuja *et al.*, 1999). Según Karp *et al.* (1998), el

ADN de calidad se debe visualizar como una banda simple en la parte superior del gel. Además, este mismo autor señala que la presencia de cualquier “smear” está relacionada a la degradación del ADN y que la contaminación por sales se hace notoria por pequeñas ondulaciones en las bandas de ADN (**Figura N°1**).

**Cuadro N°6:** Fundamentos, ventajas y desventajas de algunas técnicas para cuantificación de ADN.

Técnica	Fundamento	Ventajas	desventajas
Espectrofotometría	Medición espectrofotométrica de la absorbancia UV a 260 nm (Weising <i>et al.</i> , 2005).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estima la pureza del ADN mediante la razón <math>A_{260}/A_{280}</math> (Karp <i>et al.</i>, 1998).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Interferencia de proteínas, ARN y restos de CTAB en la medición (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> <li>• Se requiere de <math>\mu\text{g}</math> de ADN para asegurar que las lecturas sean fiables (Karp <i>et al.</i>, 1998 y Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>
Electroforesis	Capacidad del bromuro de etidio <sup>1</sup> para emitir fluorescencia al ser excitado por luz UV (Weising <i>et al.</i> , 2005) y la posibilidad que tiene esta molécula de intercalarse entre las bases de los ácidos nucleicos (Tagu y Moussard, 2003).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sólo requiere ng de ADN (Karp <i>et al.</i>, 1998 y Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> <li>• Puede ser utilizado aún si el ADN está contaminado por proteínas o ARN (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La medición es menos precisa que utilizando espectrofotometría (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>
Fluorímetro	La unión del compuesto DAPI (4', 6-diamidino-2-fenilindol) con el ADN y su posterior fluorescencia al ser excitado por el haz de luz del fluorímetro. Se requiere de un ADN patrón y se elaborará una curva de calibración (Ferreira & Grattapaglia, 1998).	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Técnica menos onerosa que la espectrofotometría (Ferreira &amp; Grattapaglia, 1998).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Se requiere de ADN mayor a 1 kb para garantizar la adecuada unión del compuesto (Weising <i>et al.</i>, 2005).</li> </ul>



**Figura N°1.** Análisis del ADN genómico extraído a partir de *Secale cereale* L. (a) ADN de buena calidad, (b) ADN degradado, (c) ADN con sales y (d) ADN con ARN. Fuente: Karp *et al.* (1998).

### 2.1.10. La PCR (polymerase chain reaction)

Weising *et al.* (2005) y Karp *et al.* (1998) sustentan que la invención de la PCR revolucionó el repertorio metodológico de la biología molecular y aunque fue diseñada como una herramienta para diagnosticar enfermedades genéticas, hoy es masivamente utilizada en diferentes áreas de investigación y ya se ha documentado su efectividad en publicaciones y libros.

Según Echenique *et al.* (2004) y Weising *et al.* (2005), algunos de los usos de esta técnica son: determinación del sexo de embriones humanos, mapeo y secuenciación del genoma, diagnóstico de enfermedades genéticas, análisis de diversidad genética (a través del desarrollo de marcadores de PCR), etc.

Tagu y Moussard (2003), Echenique *et al.* (2004) y Weising *et al.* (2005) concuerdan que la PCR (Polymerase Chain Reaction), se basa en la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de ADN a partir de la elongación de iniciadores específicos que hibridizan en las cadenas opuestas del ADN, flanqueando la región blanco. En este proceso, se hace uso de una polimerasa termoestable.

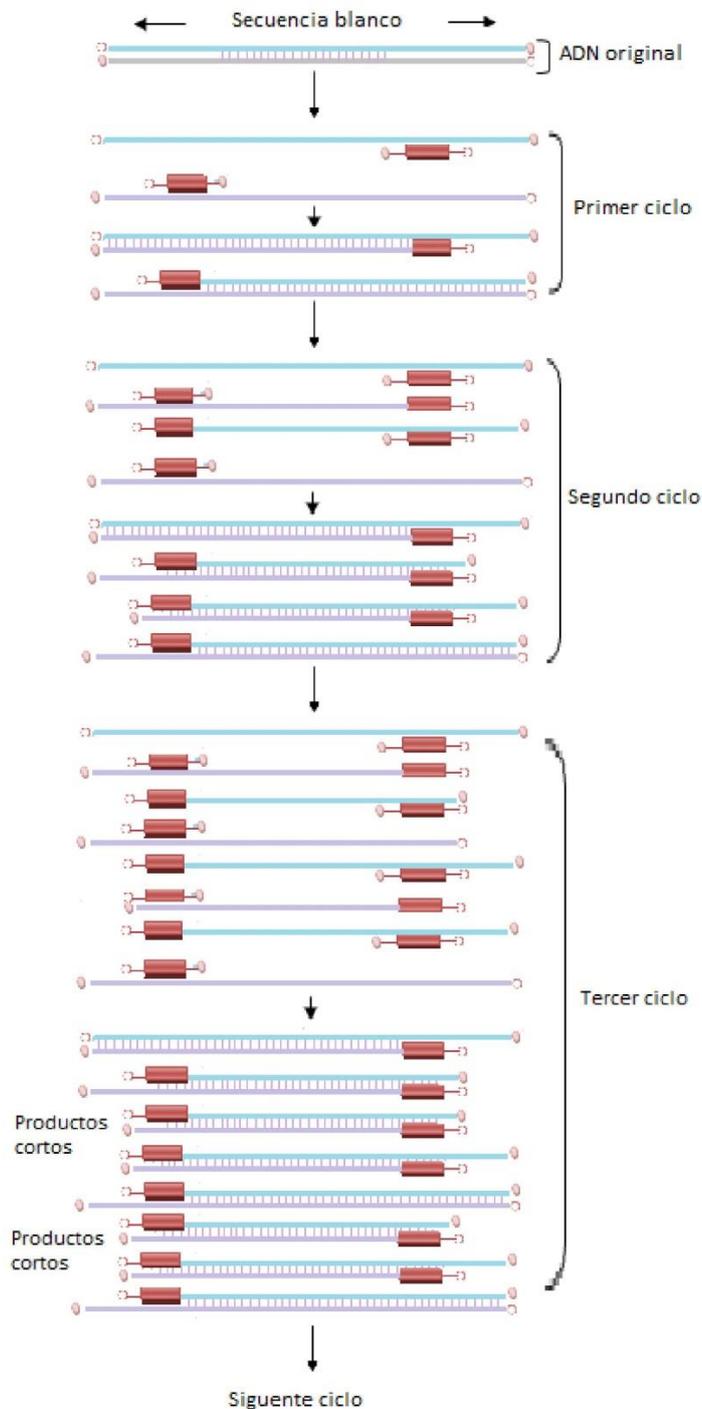
Weising *et al.* (2005) dicen que en un típico PCR, se puede discernir tres pasos con control de temperatura: desnaturalización, hibridación y elongación. Los cuales, se repiten en una serie de 25 a 50

ciclos. Durante la desnaturalización, la temperatura aumenta en un rango de 92-95°C (Echenique *et al.*, 2004) provocando que las cadenas del ADN molde se separen (Tagu y Moussard, 2003). A continuación, el descenso de la temperatura (35-65 °C dependiendo de la secuencia del iniciador y por tanto de su “melting temperature”  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$ ) así como de la estrategia experimental permite la hibridación de los iniciadores a sus secuencias complementarias en el ADN (Weising *et al.*, 2005). A esta etapa se le conoce como hibridación. Por último, la polimerasa termoestable (comúnmente la Taq polimerasa) se encarga de la elongación del iniciador y por ende de la producción de copias de los fragmentos blanco. En esta etapa, la temperatura aplicada es la temperatura óptima a la cual la enzima termoestable alcanza su mayor actividad; en el caso de la Taq polimerasa es de 72 °C (Eguiarte *et al.*, 2007).

Weising *et al.*, (2005) afirman que debido a que la extensión del extremo 3' del iniciador continuará hasta el extremo 3' de la cadena molde (**Figura N°2**), se obtendrán fragmentos de ADN que no son del tamaño esperado (Ciclo 1). En el segundo ciclo, tanto la molécula de ADN inicial como los primeros productos servirán como molde de la replicación obteniéndose dos fragmentos largos (copiados del ADN inicial) y dos fragmentos del tamaño esperado, que es el tamaño entre los iniciadores utilizados. Conforme se desarrollan los ciclos, los fragmentos de tamaño esperado (fragmentos cortos) serán amplificados exponencialmente y por tanto predominarán al final del proceso (Weising *et al.*, 2005). Estos productos, consistirán en ADN de doble cadena cuyos extremos correspondan a los extremos 5' de los iniciadores utilizados (Echenique *et al.*, 2004). **Figura N°2.**

La PCR es una técnica muy laboriosa en la etapa de estandarización, debido a que numerosos parámetros influyen en el resultado. Estos parámetros incluyen la arquitectura de los iniciadores, la actividad de la polimerasa, la concentración de los iniciadores, MgCl<sub>2</sub> y ADN molde (Weising *et al.*, 2005) así como, la calidad y pureza del

ADN (Eguiarte *et al.*, 2007). Los componentes de la reacción de PCR, sus características y rango de concentraciones se presentan en el **Cuadro N°7**.



**Figura N°2.** Principio de la reacción en cadena de la Polimerasa. Los iniciadores son representados por cuadros sombreados. Mientras que, los extremos 5'y 3' se encuentran indicados por círculos blancos y sombreados respectivamente. Fuente: Weising *et al.* (2005)

**Cuadro N°7:** Componentes de la reacción de PCR, características y rangos de concentración.

Componentes	Características	Concentración
Tampón de Reacción	Esta solución varía (según el fabricante) en el pH, el agente tamponante (Tris, TAPS, etc.) o en la presencia de componentes estabilizadores como: gelatina, tritón-x o DTT (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Algunos tampones, incluyen el magnesio necesario para la reacción (INE México, 2011).	Se proporciona en una concentración 10X. Es decir, diez veces más concentración de lo que se requiere para la PCR (Ferreira & Grattapaglia, 1998).
MgCl <sub>2</sub>	Afecta la eficiencia de la amplificación debido a que la enzima Taq polimerasa es dependiente de iones de magnesio (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Según INE México (2011), concentraciones muy altas de magnesio inhiben a la polimerasa mientras que, concentraciones bajas pueden generar productos inespecíficos.	Se proporciona en concentraciones de 25 mM o 50 mM (Ferreira & Grattapaglia, 1998). En la reacción, se utiliza de 1 mM a 4 mM (INE México, 2011).
Iniciadores	Idealmente, un iniciador específico debe tener de 15 a 25 bases de largo, contener de 40 a 60 % de GC y 55 °C como temperatura de hibridación (Weising <i>et al.</i> , 2005). Según el mismo autor, esta estructura no puede contener secuencias que le permitan la formación de horquillas, su auto complementación o su complementación con otro iniciador de la misma reacción. Un par de iniciadores que se utilizan en la misma reacción, preferentemente, deben ser del mismo tamaño, temperatura de hibridación y contenido de GC (Weising <i>et al.</i> , 2005).	-
dNTPs	Utilizados para la amplificación. Los dNTPs influyen en la PCR, ya que se unen al ión magnesio y reducen su concentración efectiva en la reacción (Dominion mbl, 2011). Por lo tanto, pequeños incrementos en su concentración podrían inhibir la reacción (INE México, 2011).	Se adquieren por separado a 100 mM de concentración (Ferreira & Grattapaglia, 1998). Según INE México (2011), para 1.5 mM de MgCl <sub>2</sub> en la reacción una concentración ideal de dNTPs es de 200 µM.
DNA polimerasa	Encargada de la reacción de amplificación. La mayoría de estas enzimas no presentan actividad exonucleasa 3'-5' (corrección), sino que tienen actividad éxonucleasa 5'-3' (Weising <i>et al.</i> , 2005) asociada a la polimerización.	Generalmente se adquiere a 5 U/µl (Ferreira & Grattapaglia, 1998).
ADN	La pureza del templado influye en los resultados de la PCR.	1 ng/µl es adecuado para la

genómico	Debido a que, restos de polifenoles, polisacáricos y ARN pueden inhibir la reacción (Weising <i>et al.</i> , 2005). Una mayor concentración de ADN en la reacción aumenta las posibilidades de contaminación (Ferreira & Grattapaglia, 1998).	amplificación del genoma de varios organismos eucarióticos con genomas nucleares de $10^8$ y $10^{10}$ pb (Ferreira & Grattapaglia, 1998).
----------	---	--

Eguiarte *et al.*, (2007) consideran que otros componentes de la reacción son: Albúmina de suero bovino (estabiliza la Taq polimeraza protegiéndola de impurezas), formamida (estabilizante de la estructura secundaria del ADN) y el dimetil sulfóxido (reduce las estructuras secundarias del ADN, útil para amplificar regiones de alta concentración de GCs)

### **2.1.11. Separación de los fragmentos amplificados**

Eguiarte *et al.* (2007) opinan que para la separación de los fragmentos obtenidos por PCR se utiliza la electroforesis en gel de agarosa o acrilamida.

#### **2.1.11.1. Principios básicos de la electroforesis**

Ferreira y Grattapaglia (1998) mencionan que la electroforesis se basa en la separación de moléculas (proteínas, isoenzimas, ácidos nucleicos) a través de una matriz (almidón, agarosa o acrilamida). La cual, funciona como un filtro separando las moléculas en un campo eléctrico de acuerdo a su tamaño y carga eléctrica. En el caso del ADN, esta molécula presenta carga negativa, en condiciones neutras, debido a su grupo fosfato.

Señala también que la separación de fragmentos de ADN depende básicamente de: la concentración de agarosa, el voltaje aplicado y el tamaño del fragmento. Los mismos autores señalan que la velocidad de migración aumenta proporcionalmente al voltaje y que a mayor concentración de agarosa mayor será la dificultad de migración de los fragmentos a lo largo de la matriz. Para la visualización de fragmentos de ADN en geles de agarosa se hace uso del bromuro de etidio o, en caso de que el ADN sea marcado con un radioisótopo

radioactivo, la autoradiografía (Tagu y Moussard, 2003). Mientras que, para la visualización de fragmentos de ADN en acrilamida se utiliza bromuro de etidio o tinción con nitrato de plata (Weising *et al.*, 2005).

Tres sistemas de amortiguación (buffers de corrida) son generalmente utilizados: TBE (Tris Boratos EDTA), TAE (Tris Acetatos EDTA) y TPE (Tris Fosfato EDTA) (Weising *et al.*, 2005). Estos tampones presentarán el pH requerido y los iones necesarios para que la corriente fluya y por tanto, el ADN pueda migrar (Eguiarte *et al.*, 2007). De los tres sistemas, El TAE es el que presenta la menor capacidad de amortiguación. Mientras que, el TBE es el de mayor poder de amortiguación (Weising *et al.*, 2005).

#### 2.1.11.2. Geles de agarosa y acrilamida

Eguiarte *et al.* (2007) añaden que la elección del tipo de matriz a utilizar depende del tamaño de fragmentos que se desee separar. Fragmentos de ADN cuyo tamaño varía entre 100 a 10 000 pb son generalmente resueltos por electroforesis en gel de agarosa mientras que, fragmentos de 6 a 2000 pb son resueltos en geles de acrilamida ( Weising *et al.*, 2005) **Cuadro N°8.**

Eguiarte *et al.* (2007) soslaya que una de las principales diferencias entre los geles de agarosa y acrilamida es que los geles de acrilamida forman poros más uniformes y de tamaño más pequeño; lo que explicaría su mayor resolución.

**Cuadro N°8:** Rangos óptimos de separación en agarosa y acrilamida no denaturada.

Agarosa		Poliacrilamida	
Porcentaje	Tamaño de fragmento (Kb)	Porcentaje	Tamaño de fragmento (Kb)
0.3	5-60	3.5	100-2000
0.6	1-20	5.0	80-500
0.7	0.8-10	8.0	60-400
0.9	0.5-7	12.0	40-200
1.2	0.4-6	15.0	25-150
1.5	0.2-3	20.0	6-100
2.0	0.1-2		

Fuente: Weising *et al.* (2005).

Weising *et al.* (2005) afirma que los geles de agarosa se preparan en concentraciones de 0.3 % a 2.5 % disolviendo la agarosa en buffer de corrida. Bajas concentraciones (0.4 a 0.8 %, a partir de 0.6 % el gel es difícil de manejar) se aplican para la corrida de ADN genómico intacto mientras que, 1.2 a 2 % se utilizan para el análisis de RAPDs, microsátélites, CAPS y RFLPs.

Por otro lado, la poliacrilamida es preparada a partir de una mezcla de monoacrilamida y bisacrilamida cuya concentración está directamente relacionada al tamaño de poro de la matriz

Macarulla (2008) considera que la copolimerización de ambos compuestos se basa en un mecanismo de radicales libres donde el radical persulfato proveniente del persulfato de amonio (APS) activa al tetrametil etilén diamina (TEMED), el cual a su vez activa al monómero de acrilamida para que polimerice. Este proceso es inhibido por el oxígeno (Weising *et al.*, 2005).

## **2.1.12. Análisis de datos**

### **2.1.12.1. Aplicación de las técnicas numéricas**

Crisci y López (1983) dicen que las técnicas numéricas son una rama de la taxonomía numérica que mediante operaciones matemáticas calcula la afinidad entre unidades taxonómicas en base al estado de sus caracteres. Según estos autores, los pasos elementales de estas técnicas son:

- A. Elección de las unidades taxonómicas operativas (OTU),
- B. Elección de los caracteres que describen al OTU,
- C. Construcción de una matriz básica de datos (MBD),
- D. Obtención de un coeficiente de similitud,
- E. Construcción de la matriz de similitud,
- F. Conformación de grupos y
- G. Generalizaciones.

Sneath y Sokal, citados por Chia (2009) mencionan que los fragmentos de ADN amplificados por técnicas de marcadores moleculares se visualizan en un gel de electroforesis como bandas de diferentes pesos moleculares. La presencia o ausencia de éstas pueden ser compartidas entre las accesiones (de aquí en adelante llamados taxa u OTUs, del inglés Operational Taxonomic Units) y por lo tanto se consideran caracteres fenotípicos distintos e independiente de los demás. Son muy utilizados los valores (1) y (0) del método binario para representar el valor de presencia o ausencia, respectivamente. Con el fin de determinar el grado de similaridad entre los individuos en estudio y agruparlos en “clusters” o ramas comunes.

#### **a. Elección de las OTU**

Crisci y López (1983) recalcan que el primer paso en cualquier proceso clasificatorio consiste en elegir las unidades a clasificar, es decir las OTU. La elección de estas unidades dependerá, en gran medida, de la estrategia y objetivos del trabajo taxonómico. Según estos mismos autores, la única regla para este paso es que cada una de las OTU deben ser internamente lo más homogéneas posibles.

#### **b. Elección de caracteres taxonómicos**

Crisci y López (1983) sostienen que todo proceso clasificatorio se basa en las diferencias existentes entre los objetos a clasificar. En este caso, estas diferencias serán evaluadas de acuerdo a los caracteres (propiedades que varían en las OTU) seleccionados.

Estos caracteres taxonómicos deben ser evaluados de manera objetiva y precisa. Es decir, los estados de estos caracteres deben ser considerados y evaluados como datos científicos. Además, para incrementar su objetividad y precisión deberán ser expresados cuantitativamente de modo que con ellos se puedan realizar cálculos. De allí que, aunque los datos no midan relaciones cuantitativas estos deben ser codificados y transformados a datos cuantitativos.

Echenique *et al.* (2004) mantienen que existen distintos tipos de datos, entre ellos tenemos los datos doble estado o binarios. Que se presentan solo cuando el carácter puede tomar dos estados que habitualmente se codifican como “0” ó “1”. Además, los datos binarios pueden indicar: presencia/ausencia y estados excluyentes (Crisci y López, 1983). En este estudio se hará uso de datos doble estado de presencia/ausencia.

**c. Construcción de la matriz básica de datos (MBD)**

Crisci y López (1983) recalcan que los datos obtenidos se presentan en forma de una tabla denominada MBD. Esta es una matriz  $n \times t$  (**Cuadro N°9**) donde las “n” columnas representan los caracteres y las “t” filas las OTU y cada casillero  $X_{ij}$  representa el valor del carácter “i” en la OTU “j”.

**Cuadro N°9:** Matriz básica de datos (MBD), donde  $X_{nt}$  corresponde al valor del carácter “n” para la OTU “t”.

MBD		Caracteres				
		1	2	3	...	n
OTU	1	$X_{11}$	$X_{21}$	$X_{31}$	...	$X_{n1}$
	2	$X_{12}$	$X_{22}$	$X_{32}$	...	$X_{n2}$
	3	$X_{13}$	$X_{23}$	$X_{33}$	...	$X_{n3}$
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮ ⋮ ⋮	⋮
	t	$X_{1t}$	$X_{2t}$	$X_{3t}$	...	$X_{nt}$

Fuente: Crisci y López (1983).

**d. Estimación del parecido taxonómico: coeficientes de similitud**

Crisci y López (1983) informan que el parecido o similitud respecto a cada par posible de OTU de una MBD es cuantificado aplicando un coeficiente de similitud Según los mismos autores estos coeficientes están divididos en tres grandes grupos: de distancia, correlación y de asociación.

Echenique *et. al.* (2004) consideran que para datos binarios es usual trabajar con medidas de asociación. Para caracterizar a dos OTU con estas medidas, se consideraran cuatro valores (Crisci y López, 1983):

- a: número de caracteres que están presentes en ambos OTU (1,1);
- b: número de caracteres que están presentes en la primera OTU mas no en la segunda OTU (1,0);
- c: número de caracteres que están ausentes en la primera OTU más no en la segunda OTU (0,1);
- d: número de caracteres ausentes en ambas OTU.

Donde, la suma de a, b, c y d son el número total de caracteres utilizados.

Echenique *et. al.* (2004) sostienen que tenemos varios tipos de coeficientes de asociación (**Cuadro N°10**), algunos de ellos no toman en cuenta a d (0,0) como elemento que aporta a la similitud.

**Cuadro N°10:** Tipos de coeficientes de asociación, nombres, formulas, tipos de datos necesarios y valores máximos y mínimos de similitud.

Tipo de coeficiente	Nombre	Formula	Tipo de dato sobre los que se aplica	Máxima similitud	Mínima similitud
Asociación	Simple matching	$\frac{a + d}{a + b + c + d}$	Doble-estado	1	0
	Jaccard	$\frac{a}{a + b + c}$			
	Rogers y Tanimoto	$\frac{a + b}{a + (2b) + (2c) + d}$			
	Dice	$\frac{2a}{2a + b + c}$			
	Sokal y Sneath	$\frac{2(a + d)}{2(a + d) + b + c}$			
	Hamann	$\frac{(a + d) - (b + c)}{a + b + c + d}$		1	-1

Fuente: Crisci y López, (1983).

#### e. Matriz de similitud

Crisci y López (1983) consideran que los resultados obtenidos de la aplicación de cualquiera de los coeficientes de similitud para los

pares posibles de OTU ordenados en forma tabular constituyen la matriz de similitud (**Cuadro N°11**). Hay que tener en cuenta que la matriz de similitud solo expone similitudes entre pares de OTU.

Ya que la similitud entre la OTU 1 y OTU 2 ( $S_{12}$ ) es la misma que  $S_{21}$ , el triángulo superior de nuestra matriz de similitud será espejo del inferior. Por tanto, no será necesario volver a colocar los datos.

**Cuadro N°11:** Matriz de similitud entre OTU, obsérvese que el valor de la diagonal principal representa a cada OTU comparado consigo mismo. Este valor corresponde a la máxima similitud.

MS		OTU				
		1	2	3	...	T
OTU	1	$S_{11}$				
	2	$S_{12}$	$S_{22}$			
	3	$S_{13}$	$S_{23}$	$S_{33}$		
	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
	t	$S_{1t}$	$S_{2t}$	$S_{3t}$	...	$S_{tt}$

Fuente: Crisci yLópez (1983).

#### f. Análisis de agrupamiento

Crisci y López (1983) instan que mediante este análisis se procede a la formación de grupos de OTU que sean similares entre sí y diferentes a los elementos de los otros grupos. Expresando de esta manera, relaciones entre la totalidad de OTU examinados.

Echenique *et. al.* (2004) manifiestan que existen muchas técnicas para formar los grupos. Una de las más usadas son las técnicas jerárquicas que pueden, a su vez, ser aglomerativas o divisivas. Esta última, va formando los grupos partiendo de un gran conjunto que contiene todos los OTU. Por el contrario, las aglomerativas empiezan considerando tantos grupos como elementos se tienen y se van agrupando según su grado de parecido. Una vez realizado el primer

agrupamiento, la distancia entre ese grupo y los restantes se calculará mediante el ligamiento simple, completo o promedio.

Crisci y López (1983) exteriorizan que en el caso del ligamiento simple, se toma en cuenta que el valor de similitud entre el OTU candidato y el grupo o núcleo ya formado es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del núcleo más parecida a ella, en otras palabras el de mayor valor de similitud. Caso contrario ocurre en el ligamiento completo donde, el valor de similitud entre el OTU candidato y el grupo o núcleo ya formado es igual a la similitud entre el candidato y la OTU integrante del núcleo menos parecida a ella, en otras palabras el de menor valor de similitud. En el caso del ligamiento promedio, se considera que el valor de similitud entre OTU a incorporarse y el núcleo es igual al promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del núcleo. Si el candidato a incorporarse es un grupo o núcleo, el valor de similitud será el promedio de los valores de similitud entre los pares posibles de OTU provenientes uno de cada grupo.

Según los mismos autores, el ligamiento promedio más utilizado es la media aritmética no ponderada (UPGMA-Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages), que es un algoritmo jerárquico que agrupa a los taxones en grupos similares, teniendo en cuenta las distancias geométricas entre OTUs. El resultado de este procedimiento se grafica en un dendograma o árbol fenético.

#### **g. Representación gráfica de las técnicas de análisis de agrupamiento**

Crisci y López (1983) comunican que la estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente como un dendograma. El cual, es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos OTU o grupos de OTU.

## **2.2. Antecedentes**

La única investigación disponible en estudios de variabilidad genética con marcadores moleculares, se encuentra en la Universidad Nacional Agraria la Molina, la tesis de Sota (2012).

Sota (2012) desarrollo la investigación, “Caracterización intragenotípica de siete accesiones de tarwi (*Lupinus mutabilis* sweet.) usando marcadores moleculares ISSR”, donde sostiene que con el fin de analizar la variabilidad genética intra accesión y las probables fuentes de flujo genético así como, poner a disposición de los fitomejoradores información importante para la utilización de este material en programas de mejoramiento se procedió a caracterizar siete accesiones de *Lupinus mutabilis* Sweet. provenientes del banco de germoplasma del INIA utilizando marcadores moleculares de Inter - Repeticiones de Secuencia Simple (ISSR). Diez iniciadores fueron seleccionados para amplificar el ADN de los 91 individuos en estudio (13 individuos por accesión) detectándose un total de 247 loci.

## **2.3. Hipótesis**

### **2.3.1. Hipótesis general**

- El estudio de la variabilidad genética de tarwi de la región de Huánuco es posible con los usos de marcadores moleculares ISSR.

### **2.3.2. Hipótesis específicas**

- Existen marcadores moleculares que tiene un alto nivel de polimorfismo en tarwi.
- Existen accesiones duplicadas según características genotípicas.
- Los patrones genéticos son bien marcados para cada accesión.
- Se encuentra variación genética entre las accesiones colectadas.

## **2.4. Variables y operacionalización de variables**

### ***Variables:***

Marcadores de ADN

**Indicadores:**

1. Contenido de Información Polimórfica (PIC).
2. Porcentaje de Loci Polimórfico (P).
3. Agrupamiento UPGMA (Dendogramas).
4. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Lugar de ejecución

Este proyecto se ejecutó en el laboratorio de Biotecnología del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina, Lima, Perú.

#### 3.2. Tipo y nivel de investigación

##### Tipo de investigación

Es aplicada, porque se recurrió a los principios de la ciencia sobre los aspectos de biología molecular y biotecnología vegetal, para brindar información a los investigadores e interesados a quienes se les dará a conocer la variabilidad con que se cuentan y a los fitomejoradores para los trabajos de mejoramiento genético.

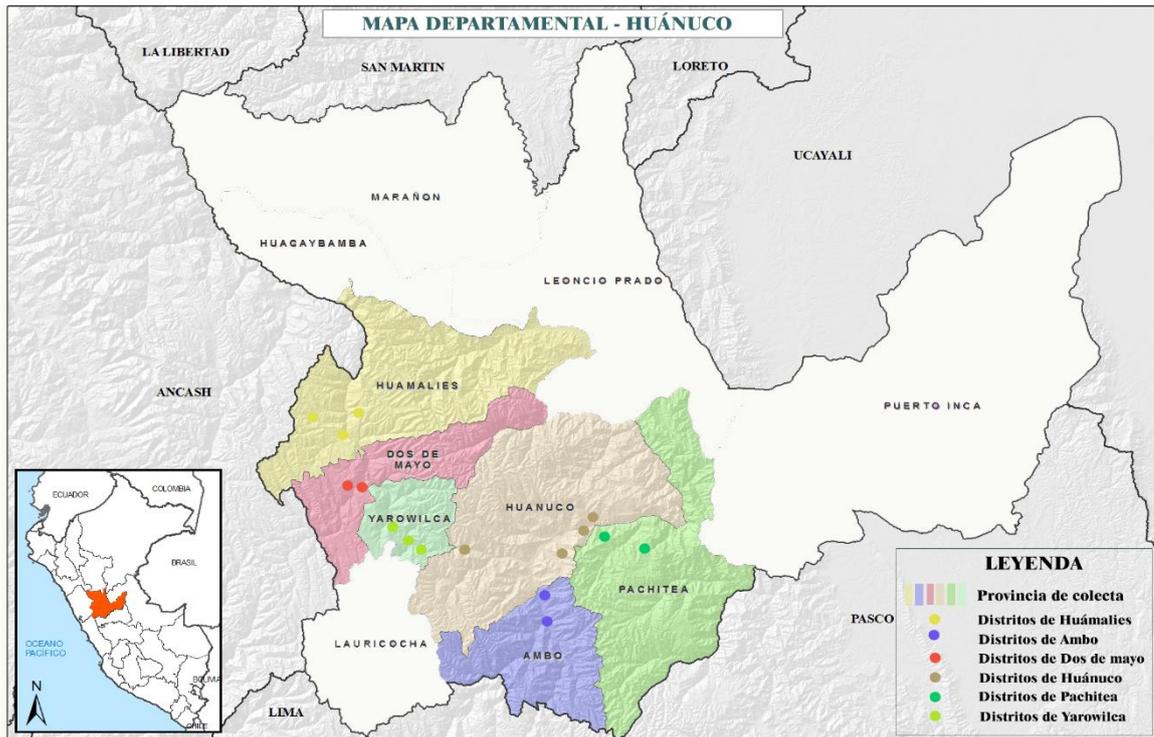
##### Nivel de investigación

Es descriptivo, porque se describe las variables en estudio (marcadores ISSR en tarwi) de las accesiones colectadas de tarwi silvestre y cultivado.

#### 3.3. Población, muestra y unidad de análisis

##### Población

Se trabajó con 137 accesiones de tarwi que corresponde al banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria la Molina que han sido colectados en diferentes caseríos de los distritos de las provincias de Pachitea, Huánuco, Ambo, Yarowilca, Dos de mayo y Huamalíes de la Región Huánuco, **Figura N°3**. En el **Anexo N°1** se detallan las características de cada una de las 137 accesiones utilizadas y el total de provincias, distritos y caseríos de colecta en el **Anexo N°2**.



**Figura N°3:** Zonas de colecta de las 137 accesiones.

## Muestra

Una muestra de ADN que representó a las hojas de tres plántulas de la misma accesión.

## Tipo de muestreo

El tipo de muestreo fue no probabilístico, porque se realizó por conveniencia del investigador.

### 3.4. Técnicas e instrumentos de laboratorio

#### Técnicas de laboratorio

- Técnicas de extracción de ADN.
- Purificación, Cuantificación y calidad del ADN
- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa)
- Electroforesis horizontal (Geles de agarosa)
- Electroforesis vertical (Geles de poliacrilamida)
- Lectura de vidrios.

### **Instrumentos de laboratorio**

- Guías de laboratorio,
- Manuales de laboratorio
- Protocolos
- Libreta de anotaciones
- Software Bio-rad del transiluminador

### **Procesamiento de la información**

Los datos de la matriz binaria o matriz básica de datos (MDB) se procesaron en los siguientes programas: hojas de cálculo del Microsoft Excel 2013 para procesar los datos de la lectura de los vidrios con la finalidad de obtener el índice de contenido polimórfico (PIC) y el porcentaje de contenido polimórfico (P), el programa NTSYSpc, (Sistema de análisis multivariado de taxonomía numérica) versión 2.2, para estimar el coeficiente de similitud según el índice de Jaccard y obtener las agrupaciones UPGMA (dendograma) y finalmente, se usó el programa Arlequin 3.5.1.2, para estudiar la estructura genética según el análisis molecular de varianza (AMOVA).

### **3.5. Equipos y materiales**

**En campo:** Tinglado o Cobertizo. Ver **Cuadro N°12**.

**Cuadro N°12:** Equipos, materiales, insumos y reactivos utilizados en el tinglado.

<b>Equipos</b>	<b>Materiales e insumos</b>	<b>Reactivos</b>
<ul style="list-style-type: none"><li>• Cámara fotográfica</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Las accesiones (ver anexos)</li><li>• Macetas</li><li>• Sticker</li><li>• Tierra agrícola</li><li>• Musgo vegetal</li><li>• Plumón</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Agua</li></ul>

**En laboratorio: ver el Cuadro N°13.**

**Cuadro N°13: Reactivos y materiales (herramientas y equipos) utilizados en cada fase del laboratorio.**

Fase de laboratorio	Reactivos	Materiales	
		Herramientas	Equipos
1. Colecta, secado y molienda de material vegetal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sílicagel</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bolsas ziploc</li> <li>• Pinzas</li> <li>• Tubos eppendorf de 1.5ml</li> <li>• Billas de metal</li> <li>• Papel toalla</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molino Bead Mill Retsch MM200</li> </ul>
2. Extracción y resuspensión de ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tampón de extracción</li> <li>• Etanol al 96 % y 70 %</li> <li>• Cloroformo-Alcohol isoamílico (24:1) Tampón Tris EDTA(TE)pH 8</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos eppendorf de 1.5ml</li> <li>• Pipetores de 1000 µl y 100 µl</li> <li>• Puntas plásticas de 100 y 1000 µl</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Centrífuga Termomixer (Eppendorf)</li> <li>• Campana extractora de gases</li> </ul>
3. Medida de la pureza y concentración del ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RNAsa 10 mg/ml</li> <li>• Agua MiliQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetores de 100 µl y 200 µl</li> <li>• Puntas plásticas de 100 µl y 200 µl</li> <li>• Placa para PCR</li> <li>• Cubetas de cuarzo</li> <li>• Papel tissue</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termomixer (Eppendorf)</li> <li>• Biofotómetro (Eppendorf)</li> <li>• Purificador de agua</li> </ul>
4. Medida de la calidad del ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarosa 1%</li> <li>• Bromuro de etidio</li> <li>• Tampón de carga</li> <li>• Buffer de corrida TBE 1x Agua miliQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetor de 10 µl con sus puntas plásticas</li> <li>• Cámara de electroforesis horizontal</li> <li>• Peines</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agitador magnético (Heidolph)</li> <li>• Fuente de poder (BIO-RAD power pac 300)</li> <li>• Gel Doc 2000 (BIO-RAD)</li> </ul>
5. Amplificación del ADN	<ul style="list-style-type: none"> <li>• dNTPs 5 mM</li> <li>• Set de iniciadores ISSR</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pipetores de 10, 100 y 200 µl con sus respectivas puntas plásticas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Termociclador Eppendorf Mastercycle gradient 96</li> </ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 10 <math>\mu</math>M</li> <li>• Enzima Taq-DNA</li> <li>• polimerasa 5 U/<math>\mu</math>l</li> <li>• buffer PCR 10x</li> <li>• MgCl<sub>2</sub> 25 mM</li> <li>• Agua miliQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Placas para PCR</li> <li>• Tubos de 500 <math>\mu</math>l</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biometra UNO-Thermoblock</li> <li>• Biometra TRIO-Thermoblock</li> </ul>
6. Electroforesis en gel de acrilamida	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acrilamida: Bis-acrilamida (19:1) al 6%</li> <li>• Tetramethylethylenediamine</li> <li>• Persulfato de amonio al 10%</li> <li>• Rain repellent</li> <li>• Adherente</li> <li>• Alcohol al 96%</li> <li>• Buffer de corrida</li> <li>• TBE 1x y 0.5X</li> <li>• 100 bp DNA Ladder Plus</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vidrios con y sin muesca</li> <li>• Peines</li> <li>• Separadores</li> <li>• Pipetores de 1000, 200 y 1000 <math>\mu</math>l con sus respectivas puntas plástica</li> <li>• Cámara de electroforesis vertical</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fuente de poder</li> </ul>
7. Fijación, tinción y revelado	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Solución de fijación, tinción y revelado.</li> <li>• Agua miliQ</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bandejas de plástico y tapas de plástico.</li> </ul>	
8. Evaluación de bandas		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fluorescente pequeño y regla</li> </ul>	
9. Otros	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Aceite mineral</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos de 200 <math>\mu</math>l</li> <li>• Gradillas para tubos</li> <li>• Recipientes de vidrio y plástico</li> <li>• Racks</li> <li>• Probetas de 100, 500 y 1000 ml</li> <li>• Beakers de: 4500, 1000, 500, 250, 100 y 50 ml</li> <li>• Picetas</li> <li>• Guantes de nitrilo y vinilo</li> <li>• Papel toalla</li> <li>• Esponjas</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balanza analítica</li> <li>• Autoclave</li> <li>• Congelador -20 °C</li> <li>• Refrigeradora 4 °C</li> <li>• Horno microondas</li> <li>• Computadora</li> <li>• Escáner</li> <li>• Vortex (Heidolph)</li> <li>• Potenciómetro</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>• Papel platino</li> <li>• Parafilm</li> <li>• Materiales de escritorio</li> <li>• Programa Quantity One</li> <li>• Programas Office 2013.</li> <li>• Arlequin 3.5.</li> <li>• NTSYSpc 2.2.</li> </ul>	
--	--	---	--

### **3.6. Conducción de la investigación**

El desarrollo de la siguiente investigación consistió en:

#### **3.6.1. Siembra de accesiones en tinglado**

Se sembraron las accesiones debidamente identificadas, en las macetas correspondientes con sustrato desinfectado (50% de compost y 50% de arena). (Sota, 2012)

Estas macetas permanecieron en el tinglado con malla antiáfida.

#### **3.6.2. Colección de material vegetal**

Una vez que ha germinado y emergido las plántulas, se colectaron 2-3 hojas a los 18-30 días después de la siembra. Se tuvo la precaución de coleccionar las hojas utilizando tijeras desinfectadas con alcohol al 70% por cada accesión.

Una vez extraído las hojas correspondientes a cada accesión se procedieron a secarlas envolviéndolos en papel toalla y este en una bolsa zipper o ziploc con sílica gel por un periodo de 2-3 días.

#### **3.6.3. Molido de las muestras secas**

Se tomaron las muestras secas (120 mg.) y se colocaron en tubos eppendorf de 1,5 ml conteniendo 6 bolitas de acero estériles que luego han sido molidas utilizando un molino Bead Mill Retsch MM200 a

temperatura ambiente a un tiempo de 6 minutos y una frecuencia de 30 Hz o 1/s, que permitió obtener un polvo fino del tejido vegetal.

#### **3.6.4. Extracción de ADN**

Los reactivos se prepararon según Velasco (2005) y extracción del ADN se realizó por el método micro CTAB (Bromuro de hexadecil trimetil amonio) modificado de Doyle y Doyle, citado por Sota (2012), Chia (2009), Tamayo (2010), Rosales (2013) y Ponce (2011) de acuerdo a los siguientes pasos:

- Se agregó 700  $\mu$ l de buffer CTAB y 4  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol a los tubos Eppendorf de 1,5 ml que contenían 120 mg de muestra seca y molida para luego mezclarlo suavemente por inversión, hasta homogenizar la muestra.
- Luego se colocó en baño maría (Termomixer Eppendorf) a 60°C, 30 minutos y 500 RPM, al terminar se dejó enfriar un rato.
- Se agregó 800  $\mu$ l de cloroformo-alcohol isoamílico en la proporción de 24:1, mezclando por inversión 40 veces y luego centrifugando a 14 000rpm por 10 minutos.
- Los 750  $\mu$ l del sobrenadante obtenido se han transferido a tubos Eppendorf vacíos y repetidos el paso anterior.
- Posteriormente, se transfirieron el sobrenadante a tubos Eppendorf de 1,5 ml conteniendo 900  $\mu$ l de etanol al 96 %, se mezcló suavemente el sobrenadante con el alcohol por 10 segundos y luego se precipito el ADN centrifugando la muestra a 13 000 rpm por 10 minutos.
- Cuando el precipitado fue visible solo se eliminó el sobrenadante y quedo listo para el siguiente paso, en algunos casos no fue posible ver el ADN entonces se centrifugó la muestra por cinco minutos más y luego se eliminó el sobrenadante.
- El pellet decantado se lavó con etanol al 70% y se dejó a temperatura ambiente por 5 minutos, se centrifugó esta vez a

13000 rpm por 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y luego se repitió el lavado y el centrifugado.

- Se eliminaron el sobrenadante y se dejaron secar toda la noche dejando los tubitos abiertos e ligeramente inclinados sobre papel toalla dentro de la campana extractora.
- Se re-suspendió el precipitado de ADN en 80  $\mu$ l de T.E. y luego se le agregó 2  $\mu$ l de ARNasa (10mg/ml) agitándose suavemente e incubándose las muestras a 37°C por 2 hora y 45 minutos.
- Finalmente las muestras fueron almacenadas a -20 °C.

### **3.6.5. Cuantificación y pureza**

La determinación de la pureza y concentración del ADN se realizó con ayuda de un Biofotómetro (Eppendorf). Para ello, se diluyó 2  $\mu$ l de muestra en 198  $\mu$ l de agua miliQ previamente autoclavada. Se utilizó como blanco 200  $\mu$ l de agua miliQ autoclavada. (Sota, 2012, Chia, 2009, Tamayo, 2010 y Rosales, 2013).

Se realizaron las lecturas en un equipo de biofotómetro (espectrofotometría, el nombre de este método de cuantificación y pureza), debido a que los ácidos nucleicos absorben la luz ultravioleta en un patrón específico. En un biofotómetro, una muestra se expone a la luz ultravioleta a 260 nm, y una foto-detector mide la luz que pasa a través de la muestra. Cuanto más luz absorbida por la muestra, mayor es la concentración de ácido nucleico en la muestra y nos brinda un dato, en este caso la tasa de absorción de  $A_{260}/A_{280}$  (a 260 nm sobre 280 nm) como es el que tiene programado el equipo, nos indica que la relación de absorción a 260 nm frente a 280 nm se usa comúnmente para evaluar la contaminación de ADN de soluciones de proteínas, ya que las proteínas absorben luz a 280 nm. (Zárate et al., 2009), luego el biofotómetro te muestra los resultados que deben ser entre los valores de 1,8 a 2,0 para considerar que mi muestra está libre de proteínas o fenoles es decir esos valores indican el grado de pureza de ADN. Una relación inferior a 1,7 indicará que pueden existir proteínas y otros elementos absorbentes de luz ultravioleta en la

muestra, una relación superior a 2,0 indicará que las muestras pueden estar contaminadas con fenol o cloroformo.

Asimismo, proporcionará directamente la concentración de la muestra (ng/μl) a partir de la fórmula empírica:  $50 \times A_{260} \times \text{Factor de dilución}$  ( $198 \mu\text{l} / 2 \mu\text{l}$ ). Donde 50 ng/μl es por regla general la concentración de ADN cuando se tiene  $A_{260} = 1,0$ .

### **3.6.6. Calidad del ADN**

La calidad del ADN fue evaluada según Gómez (2005) y realizada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %. Siguiendo los siguientes pasos:

- Preparación del gel de agarosa: se disolvió 1 g de agarosa en 100 ml de buffer TBE 1x, esta mezcla se dejó hervir en el microondas y se dejó enfriar hasta aproximadamente 45 segundos y luego se agregó 3 μl de bromuro de etidio para finalmente, verterse en el molde que ya contenía los peines. Hasta esperar que se polimerice el gel por 45 min. para retirar el peine, una vez formados los pocillos y llevarse a la cámara electroforética que debía de estar casi lleno de buffer TBE 1x. (Posso, 2009 y Martínez *et al.*, 2011).
- Preparación del Mix (Muestra): se mezcló 2 μl de muestra y 8 μl de tampón de carga, formándose un volumen de solución de 10 μl.
- Electroforesis: se cargó el mix en los pocillos del gel (7 μl del total) y se cerró la cámara, para conectar a la fuente de alimentación, seleccionados las condiciones eléctricas a 90 voltios por 30 minutos, se siguió visualmente la migración del indicador cada cierto tiempo. (Martínez *et al.*, 2011)
- Visualización con el programa Gel Doc 2000 (BIO-RAD): se retiró con cuidado el gel de la cámara y se dispuso al Gel Doc 2000 (BIO-RAD), el ADN fue visualizado y capturado su imagen por medio del programa Quantity One donde además permitió hacer los ajustes en los valores aconsejables del programa informático u observado

externamente previa protección a los rayos UV. (Tamayo, 2010, Chia, 2009, Sota, 2012 y Rosales, 2013).

### **3.6.7. Diluciones**

Una vez concluido las pruebas de concentración, pureza y calidad, se procedió a las diluciones, lo cual implicaba el uso de una fórmula muy común en varias partes del proceso:  $C1.V1=C2.V2$  (C=concentración y V=volumen).

La dilución debía de ser 10 ng/μl de la concentración total o inicial de la muestra en un volumen final de 100 μl de Agua bidestilada o miliQ., cantidad suficiente para realizar las amplificaciones de ADN por los iniciadores ISSR. (Sota, 2012)

### **3.6.8. Amplificación del ADN por medio de ISSR´s**

#### **A) Selección de iniciadores ISSR.**

Con la finalidad de elegir los iniciadores que proporcionen una mejor respuesta en términos de amplificación de bandas nítidas y polimórficas; se realizó la pre-selección de 21 iniciadores para una selección de 10 iniciadores ISSR. (Sota, 2012).

De acuerdo a varios trabajos de investigación con ISSR y su número de bandas amplificadas, porcentaje de polimorfismo y valor PIC (Índice de contenido polimórfico) de cada iniciador utilizado (Sota, 2012; Tamayo, 2012; Chia, 2009; Vargas, 2011), se ha determinado para esta investigación, el uso de 6 marcadores moleculares, en el **Cuadro N°14** se menciona la lista de iniciadores ISSR utilizados.

**Cuadro N°14:** Lista de iniciadores utilizados.

Nombre de secuencia	Secuencia 5´-3´
UCB 834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT
UCB 841	GAG AGA GAG AGA GAG AYC
UCB 835	AGA GAG AGA GAG AGA GYC
UCB 884	HBH AGA GAG AGA GAG AG
UCB 889	DBD ACA CAC ACA CAC AC
UCB 891	HDB CAC ACA CAC ACA CA

**B)** Protocolo de PCR para marcadores ISSR.

Luego de haber elegido los iniciadores en base estudios realizados con ISSR y que las muestras de ADN ya estén diluidas a 10 ng/μl se desarrolló la amplificación del ADN adaptando el protocolo desarrollado por Zietkiewicz, citado por Sota (2012). El mix de reacción para una muestra fue basado en el siguiente protocolo de PCR para marcadores ISSR. **Cuadro N°15.**

**Cuadro N°15:** Protocolo de PCR para marcadores ISSR

Reactivos	Concentración	1X(μl)	137X(μl)
ADN muestra	10ng/μl	3	411
Iniciador	10μM	0,5	68,5
dNTPs	5mM	0,5	68,5
Buffer PCR ((NH <sub>4</sub> ) SO <sub>4</sub> )	10x	1	137
Taq (Enzima)	5 U/μl**	0,3	41,1
MgCl <sub>2</sub>	25mM	1,2	164,4
H <sub>2</sub> O miliQ o ddH <sub>2</sub> O	NA*	3,5	479,5
TOTAL		7	959

\*\* Unidades de Taq ADN Polimerasa/μL.

\* No aplica

X Número de reacciones

La reacción se llevó a cabo en los termocicladores del laboratorio: Eppendorf Mastercycle gradient 96, Biometra UNO-Thermoblock y Biometra TRIO-Thermoblock. Mediante el programa

ISSR48k estandarizado para los iniciadores en caso del Eppendorf Mastercycle gradient 96, y para los otros de acuerdo al programa de amplificación para marcadores ISSR en tarwi, establecido en el Laboratorio de Marcadores Moleculares del Programa de Cereales y Granos Nativos de la UNALM.

### C) Programa de amplificación

El programa de amplificación y el programa ISSR48K consistía en: **Cuadro N°16**.

**Cuadro N°16:** Perfil térmico de la PCR para marcadores de ISSR

Perfil térmico	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización inicial	94	3´	1
Desnaturalización	94	30´´	39
Hibridación	48	45´´	
Extensión	72	2´	
Extensión final	72	6´	1
Mantenimiento	4	∞	

∞ Infinito.

Fuente: Sota, (2012) y Muchugi *et al.*, (2008)

Bajo estas condiciones de cada amplificación se añadió antes una alícuota de aceite mineral, por la naturaleza de los equipos, lo cual este impide que se evapore el master mix.

#### 3.6.9. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Según García (2000), Posso y Ghneim (2009) y Yábar (2003) se realizó siguiendo el siguiente protocolo:

##### A) Lavado de la cámara

Lavado del vidrio con pestaña y sin pestaña: con agua y agua miliQ por ambos lados con gasa (diferentes por vidrio) y detergente de

vidrio (Detergente líquido, diluido o detergente común), luego con papel toalla distintos secar todo y limpiar la cara donde se adherirá el adherente o repelente 3 veces con etanol al 96%.

Preparación del vidrio sin pestaña: Mezclar 1 ml de solución adherente (1 ml de etanol 96%, 3µl de ácido acético glacial y 3 µl de silano), luego distribuir la mezcla por la cara del vidrio en la que se adhirió el gel, utilizando papel toalla y dejar secar durante 30 min.

Preparación del vidrio con pestaña: Distribuir 1,5 ml de Rain Repellent sobre el vidrio de la cámara, utilizando papel toalla y dejar secar durante 30 min.

B) Ensamblaje de la cámara electroforética vertical

Limpiar los separadores con etanol al 96% y puestos en los bordes laterales del vidrio con pestaña, después colocar el vidrio sin pestaña (cara tratada) sobre el vidrio con pestaña finalmente presionar los vidrios a los lados y la parte inferior con ganchos metálicos (4 a cada lado).

C) Preparación del gel de acrilamida

Mezclar (preferiblemente en la campana de extracción)

- 35 ml de acrilamida 19:1 al 6%

- 350 µl de APS (persulfato de amonio al 10%.)

- 35 µl de TEMED

La mezcla se realizó rápidamente y con suavidad para evitar la formación de burbujas, se colocó los vidrios sobre la mesa, presionando los vidrios a los lados con los ganchos (4 de cada lado), y con una inclinación de 45° lentamente se vertía la acrilamida entre los vidrios, después introducir el peine entre los vidrios, presionando con ganchos se cubrió con parafilm, para luego dejar secar por 2 horas como mínimo, hasta polimerizarse.

D) Pre-corrída del gel

Se retiró los ganchos metálicos de todos los lados y se limpió con gasa o esponja de brillo, luego se retiró la cinta separadora inferior y el peine para lavar los pocillos con TBE 0,5X que limpiarían restos

de poliacrilamida, para luego colocar la placa sintética de la cámara electroforética sobre el vidrio con pestaña (ajustándolo con ganchos metálicos) y añadir sobre las cubetas tanto el superior como en el inferior el buffer de TBE 0,5X (3 Lt. aprox. en total), se volvió a Inyectar rápidamente el buffer en los pocillos teniendo en cuenta de no introducirles burbujas, finalmente se conectó la cámara electroforética a la fuente de poder (300 V, 120 mA, 40 W por 1 hora) para realizar la pre-corrída y esperar hasta que se detenga la automáticamente.

#### E) Corrida del gel

Agregar 8  $\mu$ l de tampón de carga (95% de formamida, 20 mM de EDTA, 0,05  $\mu$ l de azul de bromofenol y 0,05  $\mu$ l de xilen cianol) que debe estar almacenado la solución a 4 °C. a cada uno de los productos de PCR (volumen final 10  $\mu$ l) y desnaturalizar las muestras (productos PCR) a 94 °C durante 5 min, (al sacar colocar sobre hielo inmediatamente), siguiendo con el proceso, se agregó 3  $\mu$ l de muestra por pocillo, para determinar el peso aproximado de las bandas, se empleó 1,5  $\mu$ l de marcador de peso de 100 pb (GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus y GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder) para que corra con las muestras y por último se dejó correr las muestras a (150 V, 120 mA, 40W,) durante 8 hrs a 8 hrs con 40 min.

#### **3.6.10. Fijación, de geles con nitrato de plata**

A. Preparación de material: Los distintos pasos de la tinción se realizaron en bandejas plásticas con tapas plásticas. El nitrato de plata es sensible a la luz por esto las bandejas y las tapas debían ser opacas. Las soluciones de fijación y tinción se usaron en algunos casos hasta 10 veces, mientras que la de revelado solo 4. Todos estos guardados a temperatura ambiente. La tinción con plata involucró la manipulación de reactivos tóxicos como lo es el nitrato de plata, el formaldehído y el ácido acético, por ello se debían emplear guantes, mascarilla para la boca y gafas. De

preferencia se debía trabajar las soluciones peligrosas dentro de la cámara de extracción.

B. Preparación de reactivos: se realizaron según las guías del CIMMYT (2006) y CIP (2000).ver **Anexo N°5**.

C. Tinción: La tinción del gel con nitrato de plata consistió de 7 pasos sucesivos (Yábar, 2003):

- Fijación: Sumergir el gel durante 20 min en solución fijadora (ácido acético 10%).

Nota. En este punto el gel puede permanecer un poco más de tiempo, hasta una hora.

- Lavado con dH<sub>2</sub>O: Esperar a que escurra bien el gel del paso anterior y sumergirlo en agua bidestilada, desionizada o agua miliQ y agitarlo suavemente. Se repitió esto tres veces con cambio de agua entre el lavado. Cada lavado tenía una duración de 2 minutos, si en el último lavado se apreciaba restos de ácido acético (manchas grasosas sobre el gel) se repetía una vez más el lavado.
- Tinción: Escurrir bien el agua del gel y sumergirlo en la solución de nitrato de plata durante 20 min. Fue importante que el gel permanezca tapado durante este paso por que la luz oscurece el gel.
- Lavado con dH<sub>2</sub>O: Escurrir bien el gel, sin tardarse y sumergirlo en agua bidestilada o desionizada durante 10 segundos. Este es un paso crítico pues aquí se está retirando el exceso de nitrato de plata, si no se lavaba bien la tinción saldría muy oscura, si se lavaba mucho se perdía la nitidez de las bandas.
- Revelado: Escurrir un poco el gel y sumergirlo en la solución reveladora (Carbonato de sodio + formaldehído 37% + Tiosufato de sodio). Esta solución debía estar entre 18 y 20°C. Agitarse suavemente hasta que aparezcan las bandas de ADN (3 a 5 min). Este paso es crítico, el gel se va oscureciendo lentamente y se empiezan a ver las bandas de ADN, después se hace más rápida la tinción y se hace más difícil de frenar.

- Fijación/Parada: Escurrir el gel y sumergirlo en la solución de parada o fijación. En este paso el gel podía permanecer una hora.
- Lavado con dH<sub>2</sub>O: Escurrir bien el gel y sumergirlo en agua bidestilada o desionizada durante 5 min, hasta eliminar los rastros del ácido acético.

### **3.6.11. Recopilación de datos**

La lectura de bandas se dio en fragmentos de ADN generados en el rango de 3000 a 300 pb rango más aceptable por la técnica de Sbabou. *et al.*, citado por Sota (2012). Estas bandas observados, se codificaron mediante un sistema binario, asignando el valor “1” para la presencia y “0” para la ausencia de la banda, A los fragmentos con tenue amplificación, se les asignó un valor de 9 consignándolos como datos perdidos o missing data. Esta información de bandas se ingresó en hojas de cálculo de Microsoft Excel 2013. En esta misma hoja de cálculo, se determinó el porcentaje de datos perdidos por cada locus ingresado, de la siguiente forma: la cantidad de datos perdidos por locus se dividió entre el número total de OTUs, en este caso 137, y se multiplicó por cien. Los loci con un porcentaje de datos perdidos mayor al 10 % fueron descartados para análisis posteriores (Warburton y Crossa, 2002), formando una matriz de similitud de los datos de 137 accesiones x 6 marcadores ISSR.

Estos datos han sido leídos de manera virtual, mediante fotografías tomadas (además de ser un soporte gráfico) y de manera visual con la ayuda de un fluorescente pequeño.

### **3.6.12. Análisis de datos**

Para procesar estos datos obtenidos, se han utilizado los programas que se han mencionado en el subcapítulo 3.4. Técnicas e instrumentos de recolección y procesamiento de la información.

### **a) Estimación del índice de contenido polimórfico (PIC)**

El índice contenido de polimorfismo (PIC) es la capacidad de cada iniciador para detectar loci polimórfico. El valor más alto de PIC indica el iniciador más informativo. En el caso de marcadores ISSR considera que  $PIC = 1 - [(p/n)^2 + (q/n)^2]$  siendo p la frecuencia de bandas presentes, q la frecuencia de bandas ausentes y n el total de bandas presentes en la población, considerando que un gen se define como polimórfico si la frecuencia de uno de sus alelos es menor o igual a 0,95 ó 0,99 (Botstein *et al.*, 1980; Ghislatain *et al.*, 1999)

### **b) Estimación del Porcentaje de Loci Polimórfico (P)**

El Porcentaje de Loci Polimórficos (P) es el número de loci polimórficos entre el número total de loci (polimórficos y monomórficos) por 100 (IPGRI y Cornell University, 2004 y Legaria, 2010). El porcentaje de loci polimórficos se obtuvo utilizando el criterio del 95%, es decir que solo se considera un loci polimórfico si el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95%.

### **c) Agrupamiento UPGMA**

El análisis de agrupamiento UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic Averages) es un algoritmo jerárquico que agrupa a los taxones en grupos similares, teniendo en cuenta las distancias geométricas entre OTUs, para ello utilizada una matriz básica de datos. (Ver el apartado 2.1.12.1. aplicación de técnicas numéricas - Crisci y López, 1983).

Con el programa Ntsys 2.2. (Rolf, 2002) la MBD (matriz básica datos) se opera utilizando el coeficiente de Jaccard, para obtener la matriz de similitud entre las OTUs y luego el resultado de este procedimiento se grafica en un dendograma o árbol fenético.

El coeficiente de similitud de Jaccard, es el más utilizado en estudios de diversidad y variabilidad molecular.

El coeficiente Jaccard es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las 2 OTUs, la cual solamente cuenta las bandas presentes, las ausentes dobles se consideran como datos ausentes. Un criterio valido fue considerar que dos muestras son más parecidos cuanto más uno compartan. (Tamayo, 2010).

$$J = \frac{a}{a + b + c}$$

Donde:

a: Presencia de los dos alelos

b: Presencia del alelo en el accesión 1 y ausente en el accesión 2

c: Presencia del alelo en el accesión 2 y ausente en el accesión 1.

#### **d) Análisis de varianza molecular (AMOVA)**

En base a la matriz de base de datos del excel se calculó y analizó la varianza de las frecuencias génicas dentro y entre poblaciones de tarwi usando el análisis de varianza molecular (AMOVA) incluido en el programa Arlequín 3.5.1.2.

La estructura genética de las poblaciones fue investigada mediante un sistema de análisis de varianza, como inicialmente la definió Cockerham (1969, 1973). El enfoque del análisis de varianza molecular (AMOVA, Excoffier et al., 1992) esencialmente es similar a otros enfoques basados en el análisis de la varianza de las frecuencias génicas, sin embargo, éste toma en cuenta el número de mutaciones o diferencias entre los haplotipos moleculares (que primero necesitan ser evaluados). Cada una de las accesiones de tarwi analizadas en el presente estudio estuvo representada por un haplotipo (en el caso de los ISSR's un haplotipo consiste en el patrón de 1 y 0 que representa las bandas observadas (1) y las ausencias de banda (0) para cada individuo).

En AMOVA se divide la varianza total en términos de covarianza (Excoffier et al., 1992): entre grupos ( $\sigma^2_a$ ), entre poblaciones dentro

de grupos ( $\sigma^2_b$ ) y dentro de poblaciones ( $\sigma^2_c$ ). Entonces, la varianza total se calcula de la siguiente forma:

$$\sigma^2_t = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$$

Dichas covarianzas están generadas a partir de la suma de desviaciones de cuadrados (SSD) divididas entre sus grados de libertad (caso de covarianza  $\sigma^2_c$ ) u otros factores corregidos (demás covarianzas que tienen un factor de corrección “n”). La suma de estas nos dará la varianza total (**Cuadro N° 17**). La SSD a su vez se deriva de las diferencias o mutaciones entre individuos provenientes de diferentes categorías (entre grupos, entre poblaciones dentro de grupos y dentro de poblaciones). Entonces las covarianzas dependen básicamente de las diferencias o mutaciones entre individuos.

**Cuadro N°17:** Representación de los componentes que definen un AMOVA.

Fuentes de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados (SC)	Cuadrados medios esperados
Entre Grupos (G)	G-1	SC (Entre Grupos)	$\sigma^2_t = \sigma^2_a + \sigma^2_b + \sigma^2_c$
Entre Poblaciones (P) dentro de los Grupos	P-G	SC (Entre Poblaciones/dentro de los grupos)	$\sigma^2_b + \sigma^2_c$
Entre individuos (N) dentro de las poblaciones	N-P	SC (Entre Individuos/dentro de la poblaciones)	$\sigma^2_c$
Total	N-1	SC (Total)	$\sigma^2_t$

Fuente: Ponce, (2013).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Análisis de polimorfismo

De acuerdo a las amplificaciones del ADN (acciones) con los 6 iniciadores, que en diferentes estudios pasados ya habían dado una buena respuesta, en el presente estudio de investigación, también estos iniciadores respondieron adecuadamente a la amplificación (ver **Anexo N°4**), obteniéndose así geles de poliacrilamida con diferentes grados de polimorfismo, respecto a cada iniciador y acciones provenientes de una misma provincia.

#### 4.1.1. Estimación del Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

Se trabajó la matriz básica de datos con 137 muestras (columnas) representando las accesiones estudiadas y 213 alelos (filas) claramente distinguibles representando los alelos amplificados de los 6 iniciadores, siendo 158 polimórficos, considerando que el alelo más común tiene una frecuencia alélica máxima del 95%. El número de alelos obtenidos se observa en el **cuadro N°18**, en promedio se obtuvo 26 alelos polimórficos por iniciador en el grupo de accesiones estudiadas y un porcentaje de 73,78% de loci polimórfico como promedio.

El iniciador UCB 834 con mayor porcentaje de polimorfismo, mientras que el primer UCB 884 es el de menor porcentaje polimórfico, sin embargo este valor elevado del porcentaje de polimorfismo del iniciador UCB 884 no coincide con su índice de contenido de polimórfico (PIC) ya que tiene un PIC promedio de 0.37, mientras que el iniciador UCB 841 es el de mayor PIC promedio y el menor el iniciador UCB 891, estas diferencias surgen debido a que este PIC es el promedio de los loci polimórficos de cada iniciador y que por fórmula propia del PIC este proviene de la frecuencia alélica máxima del 95% mientras que el porcentaje de loci son los N° de loci polimórfico (al 95%) en proporción al total de loci (monomórficos y polimórfico).

**Cuadro N°18:** Polimorfismo de productos de amplificación de las 137 accesiones de *L. mutabilis*.Sweet. Donde PIC: Índice de contenido polimórfico.

Iniciador	Secuencia 5´-3´	Total Loci	Loci polimórficas		PIC Promedio
			N°	%P	
834	AGA GAG AGA GAG AGA GYT	40	35	87,50%	0.36
835	GAG AGA GAG AGA GAG AYC	39	30	76,92%	0.30
841	AGA GAG AGA GAG AGA GYC	39	29	74,36%	0.41
884	HBH AGA GAG AGA GAG AG	31	17	54,84%	0.37
889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	35	22	62,86%	0.36
891	HDB CAC ACA CAC ACA CA	29	25	86,21%	0.32
<b>Total</b>		213	158		
<b>Promedio</b>		35,50	26,33	73,78%	35,42%

#### 4.1.2. Estimación del Porcentaje de Loci Polimórfico (P)

De las 6 provincias que comprenden las 137 accesiones analizadas, el porcentaje de bandas polimórficas (%P) mostró que las accesiones de mayor variabilidad genética corresponden a la provincia de Huánuco (P=80,75%) seguida de Ambo (P=72,30%), Yarowilca (P=70,89%), Pachitea (P=43,7%), Dos de mayo (P=65,73%) y Huamalíes (P=65,26%), Ver **cuadro N°19**. La variabilidad genética del cultivo de tarwi expresada en porcentaje de loci polimórficos fue de 70,58%.

**Cuadro N°19:** Porcentaje de Loci Polimórfico por provincias de las accesiones de *L. mutabilis*.Sweet. Donde %P: Porcentaje de Loci Polimórfico

Provincia de la accesión	Tamaño de la Muestra	Número total de loci	N° de Loci polimórfico	%P
<i>Ambo</i>	18	213	154	72,30%
<i>Dos de mayo</i>	20	213	140	65,73%
<i>Huamalíes</i>	19	213	139	65,26%
<i>Huánuco</i>	29	213	172	80,75%
<i>Pachitea</i>	18	213	146	68,54%
<i>Yarowilca</i>	33	213	151	70,89%
<b>Total</b>	137.00			
<b>Promedio</b>		213.00	150,33	70,58%

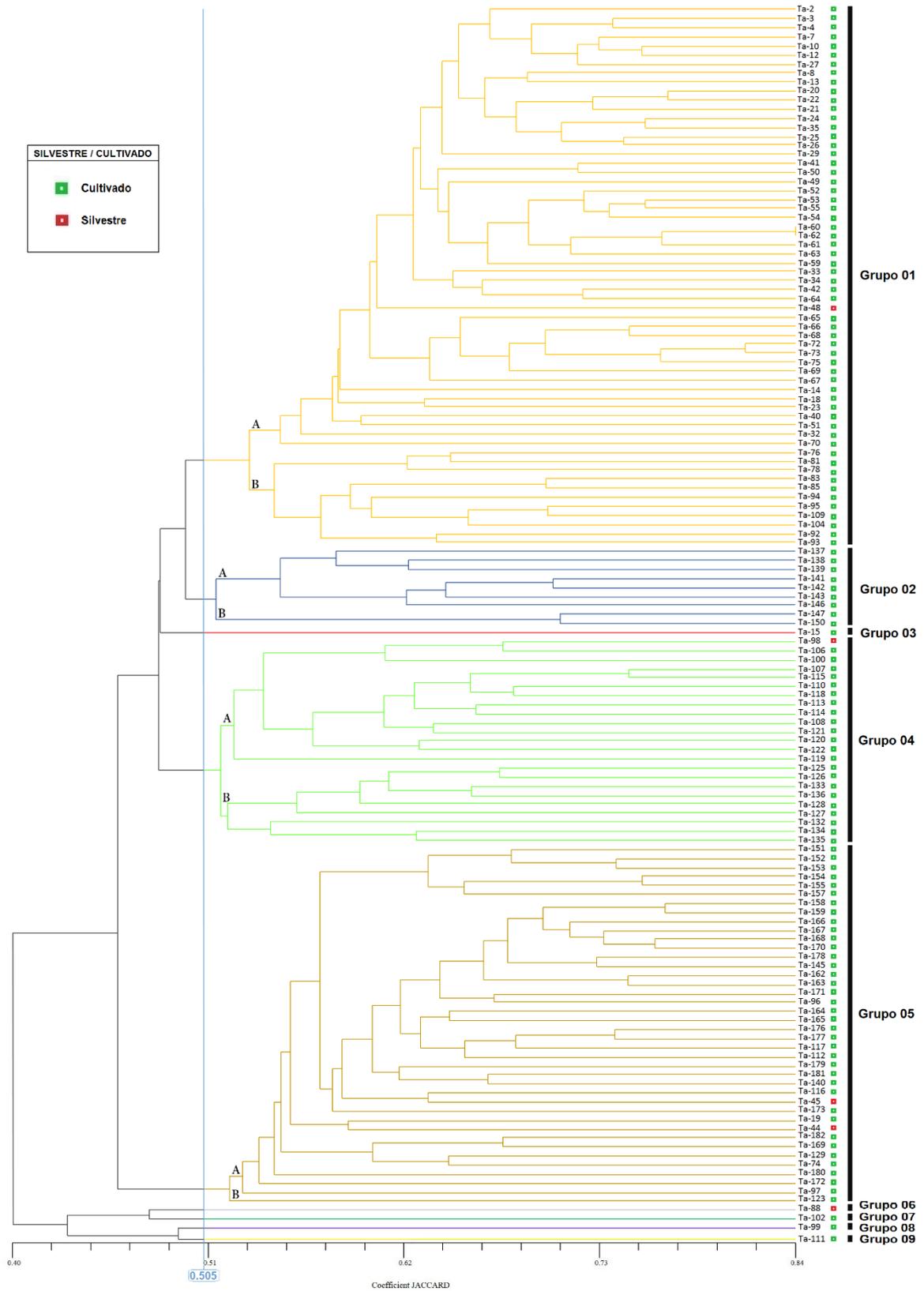
#### 4.2. Identificación de accesiones duplicadas y agrupaciones según características genotípicas

Para lograr agrupaciones a un mismo valor para todos se consideró un nivel arbitrario de 0.505 en el coeficiente de similitud de Jaccard, donde ocurre la separación de 09 grupos (**Figura N°4**), explicado de la siguiente manera:

**Cuadro N°20:** Agrupación de las accesiones según las características genotípicas a una similitud genética de 0.505 - Coeficiente de Jaccard.

Grupo	Sub grupo	Total	Descripción	Observaciones
01	A	49	Proveniente: 19 de Huamalíes (100%), 14 de Pachitea (77.78%), 08 de Ambo (44,44%) y 08 de Huánuco (27.59%).	Probablemente las accesiones de Huamalíes y Pachitea, son originarias de esas provincias, debido a su elevado porcentaje, mientras que Ambo y Huánuco hayan adquirido por intercambio o venta de semillas.  También en este Sub grupo se encuentran las dos únicas accesiones duplicadas, la Ta-60 y Ta-62 a un nivel máximo de similitud del 0.84, que pertenecen a la provincia de Huamalíes, lo que podría explicar la razón de su máximo grado de similitud, otro motivo probable es que el Ta-60 en la zona es de uso comercial y de consumo y el Ta-62 solo de consumo.
	B	11	Proveniente: 05 de Ambo (27.78%), 06 Yarowilca (18.18%).	Son accesiones que guardan características en común que necesariamente no hayan tenido que ver con intercambio de semillas, ventas u otro, sino más bien sean propios de cada lugar, explicado desde un punto de vista geográfico.
02	A	07	Proveniente: 06 de Huánuco (20,69%) y 01 de Pachitea (5,56%)	Las accesiones de Dos de mayo, Ambo y Pachitea que forman este grupo, probablemente han sido semillas adquiridas en alguna feria de Huánuco, y que estás accesiones son realmente de Huánuco, lo que explicaría que estás tres accesiones encontradas entre Dos de

	B	02	Proveniente: 01 de Dos de Mayo (5%) y 01 de Ambo (5,56%).	mayo, Pachitea y Ambo sean genotípicamente similares a las 6 accesiones de Huánuco. Consiguiendo no ser un caso de Intercambio necesariamente de semillas, por la lejanía geográfica que comprenden entre cada uno de ellos.
03	-	01	Proveniente: 01 de Pachitea (5,56%),	No guarda características genóticas similares con las demás accesiones de su provincia, ni aun así fuera otros índices de similitud mayores.
04	A	14	Proveniente: 14 de Yarowilca (42,42%).	Las accesiones de Huánuco podría haberse traído de Yarowilca, para alguna feria de venta, debido a que Yarowilca predomina en el primer grupo y en el segundo también tiene muestras con las de Huánuco.
	B	09	Proveniente: 04 de Yarowilca (12,12%) y 05 de Huánuco (17,24%).	
05	A	39	Proveniente: 19 de Dos de mayo (95%), 05 de Yarowilca (15,15%), 10 de Huánuco (34,48%), 03 de Ambo (16,67%) y 02 de Pachitea (11,11%).	El segundo grupo más variable en tener accesiones que comparten probablemente relaciones genéticas basados en su geografía.
	B	01	Proveniente: 01 de Yarowilca (3,03%).	
06	-	01	Proveniente: 01 de Ambo (5,56%)	No forma agrupación con otra accesión, aún a mayor similitud.
07	-	01	Proveniente: 01 de Yarowilca (3,03%).	Se observa que hay disimilitud genética, a pesar de haberse colectado en la misma provincia, lo que se puede inferir que estas guardan mucha diferencia genotípicamente y fenotípicamente.
08	-	01	Proveniente: 01 de Yarowilca (3,03%).	
09	-	01	Proveniente: 01 de Yarowilca (3,03%).	



**Figura N°4:** Dendrograma de las 137 accesiones de tarwi a una similitud genética de 0.505 - Coeficiente de Jaccard.

### 4.3. Identificación de grupos de accesiones según provincias de colecta.

Según el dendograma basado en similitudes genéticas (**Figura N°5**, considerando 213 loci) entre ellas y utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, se tiene 06 agrupaciones basados en el criterio que cada agrupación es la cantidad máxima de accesiones de una misma provincia.

**Cuadro N°21:** Agrupación de las accesiones según las provincias de colecta.

Agrupación	Total	Descripción
01	17	A una similitud de: 0.635. Se agruparon: 11 de Pachitea (61,11%), 05 de Huánuco (17.24%), y 01 de Ambo (5.56%).
02	12	A una similitud de: 0.635. Se agruparon: 11 de Huamalíes (57,89%), y 01 de Ambo (5,56%).
03	08	A una similitud de 0.562. Se agruparon: 06 de Yarowilca (18,18%), y 02 de Ambo (11.11%).
04	07	A una similitud de 0.540. Se agruparon: 06 de Huánuco (20,69%), y 01 de Pachitea (5.56%). Siendo esta agrupación con el mayor número de accesiones juntos de la misma provincia de Huánuco
05	23	A una similitud de 0.508. Se agruparon: 18 de Yarowilca (54,55%) y 05 de Huánuco (17,24%).
06	29	A una similitud de 0.562. Se agruparon: 17 de Dos de mayo (85%), 08 de Huánuco (27,59%), 03 de Yarowilca (9,09%) y 01 de Ambo (5,56%).

Entre las **agrupaciones 03 y 05** se encuentran 24 (72,73%) de las accesiones pertenecientes a la provincia de Yarowilca, éstas dos diferencias de similitud indica que a pesar de ser la misma provincia mantienen características variables, que les permite encontrar caracteres singulares o parecidos entre cada una de las dos agrupaciones.

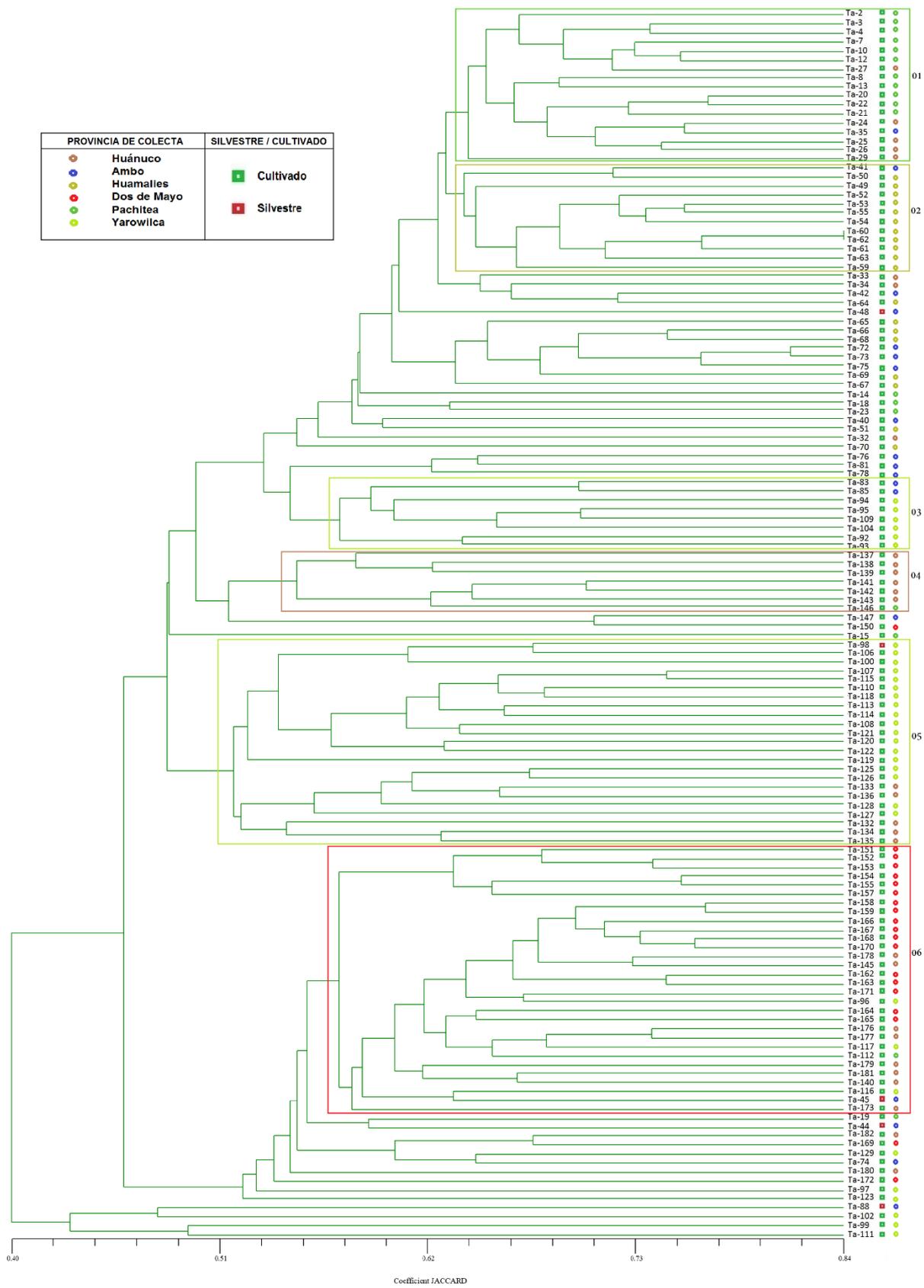
También se observa de acuerdo al dendograma que hay varias accesiones como la Ta-27, Ta-41, Ta-146, que siendo de diferentes provincias se encuentran formando perfecta agrupación con accesiones de otras provincias, lo que significa que éstas podrían haberse recolectado en un lugar

distinto a su origen, y su origen podrían ser claramente esas accesiones a las cuales se encuentra agrupado, por que comparten muchas similitud.

Las accesiones restantes de la provincia de Pachitea, Huamalíes, Yarowilca y Dos de mayo que no formaron grupo, probablemente sea debido a la mayor variabilidad y heterogeneidad existente dentro de cada accesión. Además se entiende que algunas accesiones que no han sido agrupadas con su respectiva agrupación, forman parte del intercambio de semillas, que puede haberse dado anteriormente en la provincia de Ambo y Huánuco en mayor proporción, ya que estos no logran formar un grupo significativo o que por lo menos disponga de más de 25% de accesiones (Huánuco o Ambo) juntos.

De las 05 accesiones silvestres, las 04 provenientes de Ambo no han formado una agrupación independiente entre ellas, sino más bien, la accesión silvestre Ta-45 forma parte de la **agrupación 06** con otras accesiones cultivadas, pertenecientes en su mayoría a Yarowilca, Huánuco y Ambo, e incluso forma un pequeño cluster con la accesión cultivada Ta-116 proveniente de Yarowilca, lo cual se infiere que estos están compartiendo muchas características genotípicas en común.

Por otro lado la única accesión silvestre de Yarowilca, Ta-98, se encuentra en la **agrupación 05**, conjuntamente con la gran parte de acciones de Yarowilca que además son cultivadas, lo que hace suponer que esta accesión silvestre, aunque tenga las características fenotípicas diferente, posee mucha carga genética en común a las demás accesiones de Yarowilca.



**Figura N°5:** Dendrograma de similitud genética de las 137 accesiones de tarwi respecto a su Provincia.

#### 4.4. Análisis de varianza molecular

Para analizar la distribución de la variación genética jerárquicamente, se realizó el análisis de varianza molecular (AMOVA), utilizando el programa Arlequín versión 3.5, la opción de AMOVA utilizada en este software fue calculado locus por locus. Los resultados son globales como promedios ponderados entre los loci analizados. El número de permutaciones ejecutada para el test de significancia fue de  $n = 1\ 023$ , formando 6 grupos, denominados “provincias”; poblaciones, denominados “distritos”; e individuos, denominados “accesiones”; la provincia uno “Ambo”, el dos “Dos de mayo”, el tres “Huamalíes”, el cuatro “Huánuco”, el cinco “Pachitea”, el seis “Yarowilca”, que involucran sus respectivos distritos; aunque para la provincia de “Huamalíes”, se eliminó un distrito por tener una accesión (individuo), debido a que este análisis se desarrolló con un mínimo de tres accesiones (individuos) por distrito (población).

Los resultados obtenidos con este análisis nos indican que el menor porcentaje de la variación se encuentra repartida entre las seis provincias con el 6.82%, entre los distritos dentro de las provincias se tiene el 12,51% y el mayor porcentaje de la variación se encuentra entre las accesiones dentro de los distritos con el 80,67 % del total de la variación. (**Cuadro N°22**).

**Cuadro N°22:** Análisis Molecular de Variancia con tres componentes:  
provincias, distritos y accesiones.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Componentes de variancia	Porcentaje de variación
Entre Provincias	5	545,661	1.95496 Va	6,82
Entre distritos dentro de las provincias	9	439,250	3.58406 Vb	12,51
Entre accesiones dentro de los distritos	121	2797,339	23.11850 Vc	80,67
Total	135	3782,250	28.65753	100%

Asimismo, con el mismo software se calcularon los estadísticos F promedio para todos los loci, estos parámetros se obtuvieron en función de las frecuencias alélicas:

- Fsc: 13422 (grado de diferenciación génica entre las accesiones dentro de cada distrito).
- Fst: 0.19328 (grado de diferenciación génica entre todas las accesiones).
- Fct: 0.06822 (grado de diferenciación génica entre provincias).

Sin embargo el parámetro F que se explicará es el Fst, por tratarse del grado de diferenciación génica entre todas las accesiones.

Los valores de Fst muestra una numeración que va desde cero (no existe divergencia genética) hasta 1 (fijación para alelos alternos en diferentes subpoblaciones), estos representan el grado de diferenciación genética entre las localidades, en función de las frecuencias alélicas. Cuando Fst es: de 0 – 0.05 pequeña; 0.05 – 0.15 moderada; 0.15 – 0.25 grande; mayor de 0.25 muy grande (IPGRI y Cornell University, 2004). De acuerdo a estos rangos de interpretación el grado de diferenciación génica entre las accesiones es grande (Fst=0.19328).

## V. DISCUSIÓN

### 5.1. Análisis de polimorfismo

Según Hollingsworth y Ennos, citado por Sota (2012), dos estrategias son aplicables en el análisis de la estructura genética utilizando marcadores dominantes: La primera consiste en el análisis de un gran número de accesiones utilizando pocos iniciadores mientras que, la segunda en analizar pocas accesiones y un gran número de loci. En el estudio de Sota (2012) al igual que esta investigación se hizo uso de la segunda estrategia analizando un total de 247 loci, en comparación con un total de 213 loci utilizados esta investigación. Valor que según el mismo autor, se encuentra dentro del rango de loci comúnmente analizados en estudios de variabilidad genética utilizando marcadores dominantes.

Además, en el caso de Sota (2012) un promedio de 55,2% de loci fueron monomórficos, valor que superó el mínimo requerido (20%) como control de homología (Bussell et al., citado por Sota, 2012), en este caso se han obtenido 25,82% de loci que fueron monomórficos.

#### 5.1.1. Estimación del Índice de Contenido Polimórfico (PIC)

En el **Cuadro N°12** se puede apreciar que el iniciador más informativo es la UCB 841 (PIC= 0.41), seguido por UCB 884 (PIC= 0.37), llegando a un empate los iniciadores UCB 889 (PIC= 0.36) y UCB 834 (PIC= 0.36), finalmente la UCB 891 (PIC= 0.32) y UCB 835 (PIC= 0.30), datos que se diferencian de Sota (2012), que también investigo en tarwi, manifestando que según Muthusamy *et al.*, citados por Sota (2012), los iniciadores más informativos o de mayor eficiencia para detectar loci polimórficos a través de la población analizada fue 834 (PIC= 0.39) seguido por los iniciadores 841, 835 y BOR5 todos con PIC= 0.36.

Los iniciadores de mayor contenido polimórfico se asemejan al de Chia (2009) quién trabajo en Cacao y obtuvo que los índices de

iniciadores más altos correspondían a los iniciadores con códigos UCB 841, UCB 842 y UCB 884, lo cual señala su valor potencial para su uso futuro en la caracterización de cacao usando ISSR, mientras en el caso de Tamayo (2010) que trabajo en quinua, los iniciadores 834 y 835 con un PIC 0.48 y 0.46 respectivamente fueron las mejores en detectar polimorfismo.

Por otro lado estos valores PIC obtenidos en la investigación, no guardan relación con su porcentaje de polimorfismo de los iniciadores, debido quizás a que los PIC son datos promedio del loci. Los valores de los iniciadores en porcentaje de polimorfismo son UCB 834 (P=87,50%), UCB 891 (P=86,21%), UCB 835 (P=76,92%), UCB 841 (P=74,36%), UCB 889 (P=62,86%) y UCB 884 (P=54,84%), comparando con los resultados de Sota (2012), que sí guardan cierta relación, sus porcentaje de polimorfismo fueron: UCB 834 (P=70,4%), UCB 841 (P=61,1%), UCB 884 (P=52,4%), UCB 835 (P=48,5%), UCB 891 (P=36,7%) y UCB 889 (P=30,3%), que a pesar de ser la misma especie, se debe a que las muestras de Sota (2012) provienen de otros lugares diferentes a Huánuco, además que no todas las accesiones mostraron el mismo polimorfismo con los iniciadores en esta investigación.

### **5.1.2. Estimación del Porcentaje de Loci Polimórfico (P)**

De las 137 accesiones agrupadas en 6 grupos (provincias) que han sido analizadas, el porcentaje de bandas polimórficas (%P) mostró que la accesión de mayor variabilidad genética es Huánuco (P= 80,75%) y la de menor variabilidad fue Huamalíes (P=65,26%), según Ponce (2011), concluye que podría darse debido que algunos grupos de mayor polimorfismo se justifica en su mayor número de accesiones que se encuentran en cada grupo y por consiguiente, sugiere estandarizar el número de accesiones de los grupos que conforman cada nivel, para su aplicación en futuros trabajos de variabilidad y relaciones genéticas mediante marcadores ISSR, sin embargo lo

mencionado por Ponce (2011) se descarta ya que Huánuco tuvo 29 accesiones, siendo el de mayor accesiones Yarowilca (33 accesiones y  $P=70,89\%$ ), así mismo Ambo (18 accesiones) fue el segundo grupo de mayor polimorfismo ( $P=72,30\%$ ) mientras que Huamalíes (19 accesiones) y Dos de mayo (20 accesiones), mostraron un porcentaje de polimorfismo muy cercanos de  $65,26\%$  y  $65,73\%$  respectivamente. Gracias a estos valores se puede dar una idea superficial que los mayores niveles de variabilidad en términos de polimorfismo se encuentren en tales grupos y que es necesario continuar con los estudios con muestras más grandes como lo recomienda Chia (2009).

La variabilidad genética de las accesiones de tarwi proveniente de las seis provincias del departamento de Huánuco expresaron un porcentaje de loci polimórficos promedio mucho mayor ( $P= 70,58\%$ ) que los resultados de Sota (2012), trabajados con accesiones provenientes de Cajamarca, La Libertad y Ancash, obteniendo una variabilidad expresada en porcentaje de loci polimórfico promedio de  $44,8\%$ , donde además menciona que reflejó la naturaleza de su sistema de apareamiento predominantemente autógeno pero con cierto grado de alogamia (Sevilla y Holle, citado por Sota, 2012) como es común en especies de *Lupinus* (eg. *L. albus*: Horovitz y Harding, citados por Sota, 2012). Es decir, un sistema mixto que le proporciona mayor diversidad comparada con plantas autóginas (e.g. *Amaranthus tricolor*:  $P=34\%$ , Xu y Sun, citados por Sota, 2012; frijol:  $P= 36,67\%$ , Svetleva *et al.*, citado por Sota, 2012; arroz:  $P= 28,0\%$ , Girma *et al.*, citado por Sota, 2012) pero menor con respecto a especies alógamas (eg. rabanito:  $P= 85,2\%$ , Liu *et al.*, citado por Sota, 2012; coliflor:  $P=70,77\%$ , Astarini *et al.*, citado por Sota, 2012), en contraste de esta investigación con lo mencionado por Sota (2012), el sistema de apareamiento que se refleja es del Alógamo por su porcentaje de polimorfismo de las muestras, pero esto no explica que necesariamente sean causados por su tipo de cruzamiento, sino que está accesiones

pertenecientes a cada grupo han sido desplazados hacia distintos lugares como se explicaría en el dendograma.

Según Barrett, citado por Sota (2012), la variación genética entre especies de plantas generalmente refleja diferencias en el sistema de apareamiento ya que éste está íntimamente relacionado con el flujo genético. Según el mismo autor y Garris *et al.*, citados por Sota (2012), las especies autógamas muestran baja dispersión de polen entre poblaciones lo que conlleva a una reducción de la diversidad genética dentro de la población. Por tanto, la alta variabilidad genética dentro de las accesiones analizadas pudo deberse a su sistema de apareamiento mixto; sin descartar la influencia del manejo de las accesiones durante su regeneración.

Estos niveles de variabilidad sugerirían la supervivencia de la especie frente a nuevas presiones de selección por cambios ambientales (Ma *et al.*, citado por Ponce, 2011). Sin embargo, no se descarta la pérdida de variabilidad genética por deriva génica (Jin y Li, citado por Ponce, 2011) durante su regeneración.

## **5.2. Identificación de accesiones duplicadas y agrupación según características genotípicas**

Con el fin de estimar las relaciones genéticas se construyeron dendogramas basados en similitudes genéticas utilizando el coeficiente de similitud de Jaccard, citado por Sota (2012). Cabe resaltar que este coeficiente ha sido ampliamente utilizado en el análisis de especies del mismo género como *Lupinus albus*, *L. angustifolius* y *L. luteus* (Yorgancilar *et al.*, citado por Sota, 2012)

El dendograma generado muestra que hay accesiones duplicadas en un grupo de análisis que son las accesiones Ta-60 y Ta-62 de Huamalíes, lo cual nos servirá para seleccionar que acciones seguir conservando (Farfán, 2009).

Respecto a los variabilidad que existen entre las accesiones de los nueve grupos a un  $J=0.505$  en la **Figura N°04**, se ha reportado en algunas gramíneas el incremento del grado de alogamia al ser cultivadas en ambientes tropicales o subtropicales (Unavarra, citado por Sota, 2012). Condición que probablemente se habría observado en la población al momento de realizar la colecta y hacer la data de su pasaporte y que explicaría la mezcla de color de testa observada en campo por los que recolectaron las accesiones. Cabe resaltar que el indicador “color de semilla” es uno de los mejores indicadores de polinización cruzada en *L. mutabilis* (Horovitz y Harding, citado por Sota, 2012).

Además de manera general como lo mencionó Sota (2012) no se descarta la influencia del constante flujo de material genético (semillas) entre las localidades debido a ferias locales (**Figura N°4 y N°5**) o ventas en mercados aledaños a las zonas de cultivo o a las zonas de colecta (cultivo) y/o al mal manejo del cultivo durante su regeneración.

Jin *et al.*, citado por Rosales (2013) manifiestan que para poblaciones pequeñas distribuidas en ambientes como riscos o valles que tienen pobres condiciones de crecimiento se dan 2 consecuencias genéticas: el incremento de la deriva genética y la endogamia. Esto implica que las barreras naturales pueden provocar el inicio de una diferenciación genética; en nuestro estudio, la provincia de Huánuco se encuentra en un valle que difiere de aproximadamente varios kilómetros hasta la provincia de Huamalíes, entonces en estos dos pequeños subclusters del Grupo 01 en la **Figura N°4**, aunque guarden similitud por ser del mismo grupo, deben de tener características particulares que les diferencian entre sí.

La discusión de estos resultados indican que los marcadores ISSR son herramientas poderosas para detectar bajos niveles de variación genética entre accesiones (Huang *et al.*, citado por Rosales, 2013) inclusive entre valores de coeficientes de similitud cercanos, lo que nos ayudó a identificar a las accesiones duplicadas.

### 5.3. Identificación de grupos de accesiones según provincias de colecta.

Como se observa en **Figura N°5**, los valores de similitud entre individuos de una misma provincia fueron variables, presentando los siguientes rangos para el caso Yarowilca: de  $J= 0.562$  a  $0.508$ , obteniendo mayor agrupación de accesiones en el  $J= 0.562$ , pero no todas las accesiones de Yarowilca se representaron en estas dos agrupaciones, algunos como las accesiones Ta-102, Ta-99 y Ta-111, como se observa en la **Figura N°5**, forman nuevas agrupaciones a un  $J=$  de  $0.50$ , a este mismo rango también las Ta-96, Ta-112, Ta-116, Ta-129, Ta-97 y Ta-123 forman parte de la agrupación 05 conjuntamente con las accesiones de Dos de mayo y otros, existiendo variabilidad, sea por el intercambio de semillas que puede darse en ferias locales o simple intercambio entre predios (Rosales, 2013).

Por otro lado con las accesiones de Dos de mayo, el 95% se encuentran a un  $J= 0.505$ , mientras el otro 5% en a esa misma similitud forman otra agrupación como se observa en la **Figura N°5**, describiendo que a ese rango existe mayor similitud entre las accesiones de Dos de mayo y el otro 5% podría haberse dado por intercambio de semillas a través de ferias o considerando que estas accesiones se agruparon según distribución geográfica (Ponce, 2013) entonces la accesión Ta-150, no era propio del lugar, lo que nos llevaría a indicar que existe diferenciación genética entre ese 95% de accesiones y 5% tratándose de la misma provincia (Rosales, 2013).

Las accesiones de Huamalíes como se observa en la **Figura N°5**, es la provincia con mayor similitud genética al rango de  $0.505$ , pero también la agrupación 02, reúne más accesiones juntas en el rango de  $0.635$  (**Figura N°5**), a este mismo nivel además se tiene que las accesiones Ta-64, Ta-65, Ta-66, Ta-68, Ta-69, Ta-67, Ta-51, Ta-70, forman nuevas agrupaciones con las accesiones de Ambo en su mayoría, seguido por muestras mínimas de Pachitea y Huánuco; no obstante que Ambo, Huánuco y Pachitea no son geográficamente cerca, para que haya habido variabilidad por polinización

cruzada del cultivo como lo ocurrido en las accesiones trabajadas por Sota (2012) y Tamayo (2010) en sus respectivas tesis, donde a través de ello manifiesta que la alta variabilidad genética intra accesión podrían estar relacionados con el grado de polinización cruzada del cultivo (Sevilla y Holle, citada por Sota, 2012) que, como sabemos, varía con la accesión (unavarra, citada por Sota, 2012) y según diferentes factores ambientales (humedad, luz, temperatura, etc), entonces esto podría deberse mayormente al flujo a través de la mezcla de semillas realizada por agricultores de distintas provincias o mezclas durante los viajes de colección o accesadas al banco de germoplasma (Tamayo, 2010).

De acuerdo a la gráfica que se muestra en la **Figura N°5**, las acciones de Pachitea agrupadas (61,11%) a un rango de 0.635, y los demás accesiones Ta-14, Ta-18, Ta-23, Ta-146, ta-15, Ta-112, Ta-19 agrupadas a distintos rangos de similitud, formaron parte de la mezcla de semillas que pueden haber ocurrido a través de ferias, intercambios o quizás simplemente porque en la zona también se comercializa estas semillas pero proveniente de distintas provincias. Por otro lado, la agrupación del 61,11% probablemente esté relacionada con la siembra *in situ* de semillas de estas entradas en un mismo campo de cultivo (Sota, 2012), según datos de su pasaporte y aquellas accesiones Ta-27, Ta-24, Ta-35, Ta-25, Ta-26, Ta-29, para que formen parte de esta misma agrupación probablemente sí haya habido polinización cruzada por la cercanía de los distrito que conforman las muestras (Sota, 2012); No obstante se descarta polinización cruzada con las muestras provenientes de Huamalíes, por la distancia y lo abrupto de la zona, pero sí pudo contribuir con el intercambio de semillas y/o comercio de ellas (Sota, 2012).

Un caso de mezcla de material genético ocurre con las accesiones Huánuco y Ambo que forman parte de todas las agrupaciones o clúster que se han realizado como se observa en la **Figura N°4** y **N°5**, esto sea probablemente a que en Huánuco se suele realizar ferias de agricultores como la Feria Sabatina o que es el lugar central donde se suelen reunir las personas de las distintas provincias y la relativa cercanía con esta feria local de Huánuco con Ambo podría explicar la variabilidad genética de sus accesiones, ya que

se supone la migración de este germoplasma hasta esa zona y su posterior intercambio o venta (Sota, 2012). Caso similar pudo ocurrir con las accesiones de las demás provincias que no han logrado agruparse de acuerdo a sus características geográficas.

#### **5.4. Análisis de varianza molecular**

La variación en esta investigación se encontró repartida en un mayor porcentaje por accesiones dentro de los distritos con un total de 80,67 % del total de la variación, este dato guarda relación con el parámetro  $F_{st}$  de las estadísticas "F" que son los que permiten el análisis de estructura en poblaciones subdivididas (accesiones dentro de los distritos).

En el grado de diferenciación genética entre las accesiones dentro de los distritos, en función a las frecuencias alélicas, de acuerdo a los rangos del  $F_{st}$  (IPGRI y Cornell University, 2004), existe una gran diferenciación genética ( $F_{st}=0.19328$ ), así por ejemplo, Jin et al. Citado por Rosales (2013) al trabajar con poblaciones de *Heptacodium miconioides* obtiene un valor  $F_{st}$  de 0.6633 indicando que en su estudio existe una muy alta diferenciación genética.

Además según De vicente *et al*, citado por Chia (2009), indicaría que los grupos analizadas difieren considerablemente, ya que está comprendido en el rango de 0.15 a 0.25. Asimismo, se puede interpretar indirectamente a una mayor  $F_{st}$  el flujo genético entre las poblaciones es menor.

Respecto a los resultados de Farfán (2009) donde menciona que la diferenciación genética entre individuos fue de  $F_{st}=0.085$  lo cual indica que existe una diferencia genética moderada entre ambos individuos, lo que indicaría que cada población tiene alelos bien fijados, es decir que hay alelos específicos para cada individuos dentro de la población y que otro factor importante que hace que exista esta diferenciación es que algunos loci presentan mayor frecuencia en unas individuos comparada con la otra, en esta investigación se puede concluir que con las accesiones (individuos) de tarwi trabajados no existe alelos fijos para cada accesión (individuo), sino que más bien estos pueden ser compartidos con otras accesiones (individuos).

## VI. CONCLUSIONES

- El iniciador UCB 834 tiene mayor porcentaje polimórfico a pesar que no guarda relación con su índice de contenido polimórfico, probablemente por tratarse de valores promedios y el iniciador 841 posee un mayor índice de contenido polimórfico.
- El porcentaje de loci polimórfico, la provincia de Huánuco mostró las accesiones con mayor variabilidad genética en comparación a la provincia de Huamalíes con menor variabilidad genética.
- Las accesiones Ta-60 y Ta-62, son accesiones duplicadas, además de ser provenientes de la misma provincia (Huamalíes).
- Los nueve grupos de las accesiones de acuerdo a sus características genotípicas, tienen un alto flujo de material genético entre localidades y una alta probabilidad en el incremento del grado de alogamia durante la regeneración del cultivo, que explicaría la mezcla de colores en la testa al momento de haber realizado las colectas.
- Las 137 accesiones de acuerdo a sus provincias de colecta, forman agrupaciones diversas mezcladas con otras provincias, siendo variable los valores de similitud para individuos de una misma provincia, por ejemplo las accesiones de Huánuco y Ambo forman parte de todas las agrupaciones.
- La provincia de Dos de Mayo, es la que mayor concentración grupal de sus accesiones posee en un 85%.
- Las cinco accesiones silvestres no forman una agrupación conjunta, sino más bien cuatro de ellas que pertenecen a Ambo forman parte de otras agrupaciones con provincias diferentes.
- Únicamente la accesión silvestre de Yarowilca forma una agrupación con otras acciones de su misma provincia.
- El nivel de variación genética según el AMOVA, menciona que existe gran diferenciación genética, indicando que gran porcentaje de la variación total se encuentra entre las accesiones dentro de los distritos.

## VII. RECOMENDACIONES

- Ensayar los seis iniciadores utilizados en esta investigación con muestras de tarwi de otras localidades o provincias de la misma región.
- Disponer de la misma cantidad de acciones por provincia o localidad para tener una mejor agrupación y comparación en futuras investigaciones.
- Aislar e investigar comparativamente las similitudes y disimilitudes genéticas que tienen las accesiones silvestres de las cultivadas.
- Realizar un estudio intra-accesión para determinar el posible grado de alogamia de las accesiones.
- Realizar una investigación de caracterización con marcadores moleculares dominantes pero sensibles como los marcadores moleculares SNP.
- Se recomienda contrastar la información molecular de marcadores ISSR con un estudio morfológico de las accesiones trabajadas para su posterior uso en un programa de mejoramiento genético de tarwi.

## LITERATURA CITADA

- Aljanabi, S; Forget L. y Dookun, A. 1999. An improved and rapid protocol for the isolation of polysaccharide and polyphenol free sugarcane DNA. *Plant Molecular Biology Reporter*. Pp. 1-8.
- Botstein, D; White, R; Sholmick, H y Davus, R. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism. *American Journal of Human Genetics*. Pp. 314-331.
- Camarena, F; Huaranga, A; Jiménez, J. y Mostacero. E. 2012. Revalorización de un cultivo subutilizado: Chocho o tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Primera Edición. Universidad Nacional Agraria la Molina - Consejo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación Tecnológica CONCYTEC. 222 p.
- Chia, J. 2009. Caracterización molecular mediante marcadores ISSR de una colección de 50 árboles clónales e híbridos de cacao (*Theobroma cacao* L.) de la UNAS-Tingo María. [Tesis para optar al grado de Magister en Biología Molecular]. Lima, PE. Universidad Nacional mayor de San Marcos. 136 p.
- CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. 2006. Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CIMMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT.100 p.
- CIP (International Potato Center). 2000. Molecular Biology Laboratory Protocols: Plant Genotyping. Ma. del R. Herrera, M. Ghislain, D. Zhang (eds.), Crop Improvement and Genetic Resources Department Training Manual. 3rd edition (revised October 2000), Lima, PE.
- Colosi, J. y Schaal, B. 1993. Tissue grinding with ball bearings and vortex mixer for DNA extraction. *Nucleic Acids Research*. Pp. 1051-1052.
- Cockerham, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*, Pp. 72-83.
- Cockerham, C. C. 1973. Analysis of gene frequencies. *Genetics*, Pp. 679-700.

- Congreso Internacional de la Quinoa y Granos Andinos (I, 2013, Lima, PE).
- Crisci, J y López, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. 140 p.
- Eguiarte, L; Souza, V. y Aguirre, X. 2007. Ecología molecular. México. 608 p.
- Echenique, V; Rubistein, C. y Mroginski, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Buenos Aires: INTA. Pp. 51-53, 61-68, 199-210.
- Estrada, R; Medina, T. y Roldán, A. 2006. Manual para caracterización in situ de cultivos nativos: Conceptos y procedimientos. INEIA (Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria). Lima-Perú. 168 p.
- Excoffier, L., Smouse, P., and Quattro, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. Genetics. Pp. 479-491.
- Farfán, N. 2009. Determinación de variabilidad genética mediante marcadores moleculares SSR en genotipos cultivados y silvestres de chirimoyo *Annona sp.* del banco de germoplasma del INIA procedentes de 5 regiones del Perú. [Tesis para optar al grado de Ingeniero Agronomo]. CUSCO– PERU, Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco. 149 p.
- Ferreira, M. y Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia: Embrapa- cenargen. 218 p.
- García, H. 2000. Electroforesis en geles de poliacrilamida: fundamentos, actualidad e importancia. Laboratorios Beterá. Pp. 21-31.
- Ginwal, H. y Singh, S. 2010. Evaluation and optimization of DNA extraction method for Dalbergia sissoo leaf. Ind. J. Biotechnology Vol. 9. Pp. 69-73
- Gómez, J. 2005. Optimización de un protocolo para la extracción de ADN de *Pantago major* dirigida a la tipificación molecular. [Tesis para optar al grado de Ingeniería en Biotecnología]. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa rica. 54 p.

- Hameed, A; Akbar, S; Iqbal, N; Arshad, R. and Farooq, S. 2004. A rapid (100 min) method for isolating high yield and quality DNA from leaves, roots and coleoptile of wheat (*Triticum aestivum* L.) Suitable for apoptotic and other molecular studies. Int. J. Agri. Biol. Pp. 383-387.
- INTA (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria). 2010. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. Segunda Edición. ARGENBIO - Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 650 p.
- IPGRI (Instituto Internacional de recursos Fitogenéticos) y Cornell University. 2004. Análisis de la diversidad genética utilizando datos de marcadores moleculares: Medidas de Diversidad. 86 p. Consultado el 20 de octubre del 2014 [En línea] Disponible en:
- [http://web.ecologia.unam.mx/laboratorios/fmolina/pdf/lab/gen/Medida\\_de\\_la\\_diversidad\\_genetica.pdf](http://web.ecologia.unam.mx/laboratorios/fmolina/pdf/lab/gen/Medida_de_la_diversidad_genetica.pdf)
- Joshi, S; Gupta, V; Aggarwal, R; Ranjekar, P y Brar, D. 2000. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza*. Pp. 1311-1320.
- Karp, A; Isaac, P. e Ingram, D. 1998. Molecular tools for screening biodiversity plants and animals. Great Britain: Chapman & Hall. Pp. 5-24
- Khanuja, S; Shasany, A; Darokar, M. and Kumar S. 1999. Rapid isolation of DNA from dry and fresh samples of plants producing large amounts of secondary metabolites and essential oils. Plant Molecular Biology Reporter. Pp. 17:1-7.
- Legaria J. 2010. Diversidad genética en algunas especies de amaranto (*Amaranthus* spp.). Rev. Fitotec. Mex. 95 p.
- Macarulla, J. 2008. Bioquímica. Barcelona: Reverté; 2008. Pp. 72-73.
- Mansilla, R. 2001. Caracterización genética molecular de *Smallanthus sonchifolius* (Poepp & Endl) H. Robinson "Yacón" mediante marcadores RAPD. [Tesis para optar al grado de Biólogo]. Lima: Universidad Agraria La Molina. Pp. 39-40, 60-63.
- Martínez, M; Farias, A; Ballesteros, L; Abrego, L. 2011. Manual de prácticas biología celular y molecular II. 50 p.

- Matasyoh, L; Wachira, F; Kinyua, M; Thairu, A. and Mukiyama, T. 2008. Leaf storage conditions and genomic DNA isolation efficiency in *Ocimum gratissimum* L. from Kenya. Afr. J. Biotechnology Vol. 7. Pp. 557-564.
- MINAG (Ministerio de Agricultura). 2011. Diversidad genética. Consultado el 15 de Noviembre del 2012. [En línea] Disponible en:
- <http://www.minag.pe/portal/sector-agrario/recursos-naturales/recurso-biodiversidad/diversidad-gen%C3%A9tica>
- MINAGRI (Ministerio de Agricultura y Riego). 2014. Datos estadísticos de tarwi. (Correo electrónico con Sánchez, L.). Oficina de estudios económicos y estadísticos-Ministerio de Agricultura y Riego. Lima, PE.
- Mujica, A. *et al.* 2001. Investigaciones en Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet). Universidad nacional del altiplano. Puno - Perú. 92 p.
- Muchugi, A; Kadu, C; Kindt, R; Kipruto, H; Lemurt, S; Olale, K. *et al.* 2008. Molecular markers for tropical trees. World agroforestry centre. 100 p.
- Mujica, A. s.f. La Agricultura andina: granos y leguminosas andinas. Consultado el 21 de Octubre del 2013. [En línea] Disponible en:
- [http://www.rlc.fao.org/es/Agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap3\\_2.htm](http://www.rlc.fao.org/es/Agricultura/produ/cdrom/contenido/libro09/Cap3_2.htm)
- Novaes, R; Rodrigues, J. and Lovato M. 2009. An efficient protocol for tissue sampling and DNA isolation from the stem bark of Leguminosae trees. Genetics and molecular research Pp.86-96.
- Ponce, C. 2011. Diversidad y relaciones genéticas de amaranto grano (*Amaranthus spp.* L.) mediante marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). [Tesis para optar al grado de Magister Scientiae en Mejoramiento Genético de Plantas]. LIMA – PERU, Universidad Nacional Agraria la Molina. 87 p.
- Ponce, R. 2013. Caracterización molecular de la variedades de papas cultivadas (*Solanum spp.*) más importantes del Perú mediante el uso de microsatélites. [Tesis para optar al grado de Biólogo Genetista Biotecnólogo]. LIMA – PERU, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 144 p.
- Posso, D. 2009. Electroforesis en geles de agarosa. Protocolos de laboratorio. Unidad de Ecología Genética (UEG). 4 p.

- Posso, D. y Ghneim, T. 2009. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de poliacrilamida. Protocolos de laboratorio UEG. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas, Altos de Pipe- Venezuela. 14 p. Consultado el 20 de Abril del 2013. [En línea] Disponible en: <http://www.ivic.gob.ve/ecologia/ueg/>
- Puchooa, D. 2004. A simple, rapid and efficient method for the extraction of genomic DNA from lychee (*Litchi chinensis* Sonn.). Afr. J. Biotechnology Vol. 3. Pp. 253-255.
- Rosales, E. 2013. Caracterización molecular de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen.) usando marcadores moleculares ISSR (Inter Simple Sequence Repeats). [Tesis para optar al grado de Biólogo]. LIMA – PERU, Universidad Nacional Agraria la Molina. 47 p.
- Sota, F. 2012. Caracterización Intragenotípica de Siete Accesiones de Tarwi (*Lupinus mutabilis* Sweet.) usando Marcadores Moleculares ISSR. [Tesis para optar al grado de Biólogo]. LIMA – PERU, Universidad Nacional Agraria la Molina. 101 p.
- Tagu, D. y Moussard, C. 2003. Fundamentos de las técnicas de biología molecular. Zaragoza: ACRIBIA S. A. Pp. 12-13, 146-148.
- Tamayo, L. 2010. Caracterización molecular inter e intra genotípica de 16 accesiones de *Chenopodium quinoa* (Quinoa) mediante la técnica de ISSR. [Tesis para optar al grado de Magister scientiae]. LIMA – PERU, Universidad Nacional Agraria la Molina. 84 p.
- Tapia, M. y Fries, A. 2007. Guía de campo de los cultivos andinos. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Perú. 222 p.
- Vargas, P. 2011. Análisis de la diversidad genética de 21 accesiones de piñon (*Jatropha curcas* L.) utilizando marcadores de tipo ISSR (Intermicrosatélites). [Tesis para optar al grado de Ingeniería Agrónomo]. Zamorano, Honduras. 26 p.
- Velasco, R. 2005. Molecular markers and the DNA extraction. Facultad de ciencias agropecuarias. Vol. 3 N° 1. Consultado el 15 de Julio del 2013. [En línea] Disponible en:
- <http://www.unicauca.edu.co/biotecnologia/ediciones/vol3/Art32.pdf>

- Warburton, M; Crossa, J. 2002. Data Analysis in the CIMMYT Applied Biotechnology Center. For Fingerprinting and Genetic Diversity Studies. CYMMYT, México. 29 p.
- Weising, K; Nybom, H; Wolff, K. and Kahl, G. 2005. DNA Fingerprinting in plants, principles, methods and applications. Second edition. USA: Taylor & Francis. 470 p.
- Yábar, C. 2003. Manual de procedimientos de electroforesis para proteínas y adn. Ministerio de salud, instituto nacional de salud, Serie de normas técnicas N° 38. Lima-Perú. 59 p.
- Zárate, P; Jiménez, CA; Badillo, J. y Garibay, C. 2009. Manual del laboratorio de biotecnología molecular. México. 52 p.
- Zegarra, G. 2010. Actividad deterrente y acaricida de principios activos de quinuas amargas, aceites esenciales y tarwi. [Tesis para optar al grado de Licenciado en Química]. LIMA – PERU. Pontificia Universidad Católica del Perú. Pp. 27-29.

## ANEXOS

**ANEXO N°1:** Datos de pasaporte de las 137 accesiones de tarwi de la región Huánuco del banco de germoplasma del Programa de Cereales y Granos Nativos – UNALM.

Accesión	Provincia	Distrito	Caserío	Altitud (msnm)	Latitud	Longitud	Silvestre o cultivada	Nombre local
Ta- 2	Pachitea	Panao	Pulijaj	2986	09 49'.015	75 52' 979	cultivado	tauri negro
Ta- 3	Pachitea	Panao	Pulijaj	2987	09 49'.015	75 52' 979	cultivado	tauri blanco
Ta- 4	Pachitea	Panao	Pulijaj	3028	09 55'.489	075 59'.335	cultivado	tauri blanco
Ta- 7	Pachitea	Panao	Pulijaj	3054	09 55'.487	075 59'.335	cultivado	chocho jaspeado
Ta- 8	Pachitea	Panao	Pulijaj	3054	09 55'.487	075 59'.335	cultivado	chocho pinto
Ta- 10	Pachitea	Panao	Tonapuco	2869	09 59.487	75 59.335	cultivado	chocho blanco
Ta- 12	Pachitea	Umari	Pinkiray	2710	09 55 487	075 59 335	cultivado	chocho blanco
Ta- 13	Pachitea	Umari	Pinkiray	2710	09 55 487	075 59 335	cultivado	chocho negro
Ta- 14	Pachitea	Umari	Pinkiray	2710	09 55 487	075 59 335	cultivado	chocho jaspeado
Ta- 15	Pachitea	Umari	Pinkiray	2681	09 55 487	075 59 335	cultivado	chocho blanco
Ta- 18	Pachitea	Umari	Piñapampa	3028	09 53'.133'	076 20'726	cultivado	chocho jaspeado
Ta- 19	Pachitea	Umari	Illarumi	3091	09 50'.902	75 57'856	cultivado	tauri negro
Ta- 20	Pachitea	Umari	Illarumi	3091	09 50'.902	75 57'856	cultivado	chocho shinya
Ta- 21	Pachitea	Umari	Illarumi	3091	09 50'.902	75 57'856	cultivado	chocho garhuash
Ta- 22	Pachitea	Umari	Illarumi	3091	09 50'.902	75 57'856	cultivado	chocho boca negra
Ta- 23	Pachitea	Umari	Illarumi	3091	09 50'.902	75 57'856	cultivado	chocho blanco
Ta- 24	Huánuco	Churubamba	Vinchos	2679	09 46'440	076 05'603	cultivado	tauri blanco
Ta- 25	Huánuco	Churubamba	Vinchos	2679	09 46'440	076 05'603	cultivado	tauri llana shimi
Ta- 26	Huánuco	Churubamba	Vinchos	2679	09 46'440	076 05'603	cultivado	tauri murucsho
Ta- 27	Huánuco	Churubamba	Gonya-vinchos	2770	09 46'785'	076 08'797'	cultivado	tauri blanco

Ta- 29	Huánuco	Churubamba	Gonya-vinchos	2859	09 47'.039	076 09'046'	cultivado	tauriquita blanco
Ta- 32	Huánuco	Churubamba	Gonya-vinchos	2933	09 49'.034	076 09'.063	cultivado	tauri blanco
Ta- 33	Huánuco	Churubamba	Cochabamba	2908	09 47'.277	076 09'.193	cultivado	tauri blanco
Ta- 34	Huánuco	Churubamba	Cochabamba	2802	09 47'.277	076 09'.193	cultivado	tauri blanco
Ta- 35	Ambo	Comchamarca	Tayapampa	3109	09 47'.277	076 09'.193	cultivado	tauri blanco
Ta- 40	Ambo	Comchamarca	Tayapampa	3108	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	chocho blanco
Ta- 41	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3196	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	yorac tauri
Ta- 42	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3196	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	tauri blanco
Ta- 44	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3259	10 05'.211	076 18'.430	silvestre	muro sachatauri
Ta- 45	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3259	10 05'.211	076 18'.430	silvestre	yoraj muro tauri
Ta- 48	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3259	10 05'.211	076 18'.430	silvestre	jirka tauri maron
Ta- 49	Huamalíes	Puñus	chupancancha	3685	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	yuraj tauri -blanco
Ta- 50	Huamalíes	Puñus	chupancancha	3680	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	yuraj tauri -blanco
Ta- 51	Huamalíes	Puñus	chupancancha	3680	10 05'.211	076 18'.430	cultivado	chocho blanco mejorado
Ta- 52	Huamalíes	Puñus	Puñus	3628	09 30'042	076 53'.041	cultivado	yuraj tauri -común
Ta- 53	Huamalíes	Puñus	Puñus	3693	09 30' 064	076 53'.183	cultivado	chocho blanco común
Ta- 54	Huamalíes	Puñus	Puñus	3699	09 30' 059	076 53'.162	cultivado	yoraj tauri común
Ta- 55	Huamalíes	Puñus	Puñus	3593	09 30'057	076 53'.162	cultivado	chocho blanco común
Ta- 59	Huamalíes	Miraflores	Señor de mayo	3460	09 30'.057	076 53'.162	cultivado	chocho blanco mejorado-altagracia
Ta- 60	Huamalíes	Puñus	Bellabamba	3544	09 30'.057	076 53'.162	cultivado	yuraj tauri
Ta- 61	Huamalíes	Puñus	Bellabamba	3550	09 30'.057	076 53'.162	cultivado	chocho blanco común
Ta- 62	Huamalíes	Puñus	Bellabamba	3550	09 30'.057	076 53'.162	cultivado	muro tauri
Ta- 63	Huamalíes	Puñus	Bellabamba	3644	09 31'.445	076 52.027	cultivado	tauri blanco -altagracia
Ta- 64	Huamalíes	Puñus	Bellabamba	3644	09 31'.445	076 52.027	cultivado	chocho blanco altagracia
Ta- 65	Huamalíes	Puñus	Huamanchaca	3570	09 31'.455	076 52'.040	cultivado	tauri blanco mejorado
Ta- 66	Huamalíes	Puñus	Huamanchaca	3570	09 31'.455	076 52'.040	cultivado	chocho blanco

Ta- 67	Huamalíes	Puños	Huamanchaca	3587	09 31'.455	076 52'.040	cultivado	chocho blanco común
Ta- 68	Huamalíes	Llata	Canchapampa	3400	09 33'.483	076 50'.140	cultivado	chocho blanco mejorado
Ta- 69	Huamalíes	Llata	Canchapampa	3401	09 33'.434	076 50'.109	cultivado	tauri blanco común
Ta- 70	Huamalíes	Llata	Canchapampa	3386	09 33'.003	076 49'.113	cultivado	chocho blanco y negro común
Ta- 72	Ambo	Tomayquichua	chinchubamba	2817	09 32'. 840	076 49'. 430	cultivado	tauri blanco
Ta- 73	Ambo	Tomayquichua	chinchubamba	2817	09 32'. 840	076 49'. 430	cultivado	murú tauri
Ta- 74	Ambo	Tomayquichua	Lucmas	2824	09 32'. 840	076 49'. 430	cultivado	tauri blanco
Ta- 75	Ambo	Tomayquichua	Lucmas	2824	09 32'. 840	076 49'. 430	cultivado	chochos muro
Ta- 76	Ambo	Tomayquichua	Lucmas	2844	10 03'.357	076 11'.522	cultivado	chocho blanco
Ta- 78	Ambo	Tomayquichua	Lucmas	2844	10 03'.357	076 11'.522	cultivado	muro tauri
Ta- 81	Ambo	Comchamarca	Keropaqui	3127	10 03'.537	076 11'.555	cultivado	chocho blanco
Ta- 83	Ambo	Comchamarca	Keropaqui	3127	10 03'.537	076 11'.555	cultivado	tarwi jaspeado
Ta- 85	Ambo	Comchamarca	Keropaqui	3164	10 03'.537	076 11'.555	cultivado	tauri blanco
Ta- 88	Ambo	Comchamarca	Colisragra	3192	10 03'.537	076 11'.555	silvestre	chocho silvestre -muro
Ta- 92	Yarowilca	Obas	Obas	3398	10 03'.537	076 11'.555	cultivado	llana tauri
Ta- 93	Yarowilca	Obas	Obas	3398	10 03'.537	076 11'.555	cultivado	yorac tauri
Ta- 94	Yarowilca	Obas	Gachgapampa	3420	09 47'.990	076 40'.218	cultivado	chocho blanco
Ta- 95	Yarowilca	Obas	Gachgapampa	3420	09 47'.990	076 40'.218	cultivado	yana chochos
Ta- 96	Yarowilca	Obas	Gachgapampa	3420	09 47'.990	076 40'.218	cultivado	tauri amarillo
Ta- 97	Yarowilca	Obas	Gachgapampa	3420	09 47'.990	076 40'.218	cultivado	chocho murushito
Ta- 98	Yarowilca	Obas	Gachgapampa	3420	09 47'.990	076 40'.218	silvestre	salis chochitos
Ta- 99	Yarowilca	Obas	Shunquipampa	3390	09°,47'.989	076 40'.202	cultivado	tauri negro
Ta- 100	Yarowilca	Obas	Shunquipampa	3390	09°,47'.989	076° 40'.202	cultivado	chocho blanco
Ta- 102	Yarowilca	Obas	Shunquipampa	3394	09°,47'.987	076° 47'.988	cultivado	tauri negro
Ta- 104	Yarowilca	Obas	Jeccho	3289	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	tauri blanco
Ta- 106	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	tauri blanco
Ta- 107	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	tauri amarillo

Ta- 108	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	chocho murushito
Ta- 109	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	pinto amarillo
Ta- 110	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	pinto marron
Ta- 111	Yarowilca	Obas	Umpash	3316	09°,47'.989	076° 40'.201	cultivado	tauri negro
Ta- 112	Pachitea	Panao	Tonapuco	2723	09 55 704	075 59 114	cultivado	chocho blanco
Ta- 113	Yarowilca	Obas	Shiris Upianan	3439	09°,49'.130	076° 39'.648	cultivado	chocho negro
Ta- 114	Yarowilca	Obas	Shiris Upianan	3439	09°,49'.130	076° 39'.648	cultivado	chocho blanco
Ta- 115	Yarowilca	Obas	Shiris Upianan	3439	09°,49'.130	076° 39'.648	cultivado	muro chocho
Ta- 116	Yarowilca	Obas	Shiris Upianan	3439	09°,49'.130	076° 39'.648	cultivado	chocho amarillo
Ta- 117	Yarowilca	Obas	Shiris Upianan	3439	09°,49'.130	076° 39'.648	cultivado	boca amarillo
Ta- 118	Yarowilca	Obas	Chillicsa Huachanan	3462	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	llana tauri
Ta- 119	Yarowilca	Obas	Chillicsa Huachanan	3462	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	lloraj tauri
Ta- 120	Yarowilca	Obas	Chillicsa Huachanan	3462	09°,49'.763	076° 39'.426	cultivado	muro tauri
Ta- 121	Yarowilca	Cahuac	Cahuac	3250	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	chocho blanco
Ta- 122	Yarowilca	Cahuac	Cahuac	3250	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	chocho marron
Ta- 123	Yarowilca	Cahuac	Santa Rosa Cahuac	3283	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	yanachochos
Ta- 125	Yarowilca	Cahuac	Santa Rosa Cahuac	3295	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	tauri blanco
Ta- 126	Yarowilca	Cahuac	Santa Rosa Cahuac	3305	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	chocho blanco
Ta- 127	Yarowilca	Choras	Garu	3462	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	tauri blanco
Ta- 128	Yarowilca	Choras	Garu	3462	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	murú tauri
Ta- 129	Yarowilca	Choras	Garu	3462	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	yanatauri
Ta- 132	Huánuco	Amarilis	Macchi	3067	09°,49'.761	076° 39'.424	cultivado	chocho blanco
Ta- 133	Huánuco	Amarilis	Gayto	3080	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco
Ta- 134	Huánuco	Amarilis	Gayto	3080	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	muro chochos
Ta- 135	Huánuco	Amarilis	Ñaupamarca	3298	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco
Ta- 136	Huánuco	Amarilis	Shishmay	3069	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco
Ta- 137	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	3744	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco
Ta- 138	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	3761	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri blanco

Ta- 139	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	3761	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri muro
Ta- 140	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	3761	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yanatauri
Ta- 141	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	2886	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	muro tauri
Ta- 142	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	2886	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 143	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	2897	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho shiurisito-shillquito
Ta- 145	Huánuco	Valle	Santa Rosa de Marambuco	2879	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	muro tauri
Ta- 146	Pachitea	Umari	Pinkiray	2710	09°,55'.487	075° 59'.335	cultivado	mezcla de negro,blanco,jaspeado
Ta- 147	Ambo	Comchamarca	Huarqui	3257	10°,05'.211	076° 18'.430	cultivado	chocho blanco
Ta- 150	Dos de Mayo	Pachas	Buenos Aires	3369	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri blanco
Ta- 151	Dos de Mayo	Pachas	Parashapata	3500	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco criollo
Ta- 152	Dos de Mayo	Pachas	Parashapata	3500	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco mejorado
Ta- 153	Dos de Mayo	Pachas	Parashapata	3500	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho murushito
Ta- 154	Dos de Mayo	Pachas	Nuñash	3269	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 155	Dos de Mayo	Pachas	Nuñash	3269	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri muro
Ta- 157	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3392	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 158	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3392	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	marron tauri
Ta- 159	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3358	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 162	Dos de Mayo	yanas	Barrio Independiente	3328	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yana tauri -negro
Ta- 163	Dos de Mayo	yanas	Barrio Independiente	3328	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	muro tauri
Ta- 164	Dos de Mayo	yanas	Barrio Independiente	3328	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 165	Dos de Mayo	yanas	Barrio Independiente	3328	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	marron tauri
Ta- 166	Dos de Mayo	Yanas	Jirkayacu	3377	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocho blanco
Ta- 167	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3351	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yuraj tauri
Ta- 168	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3351	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	muro tauri

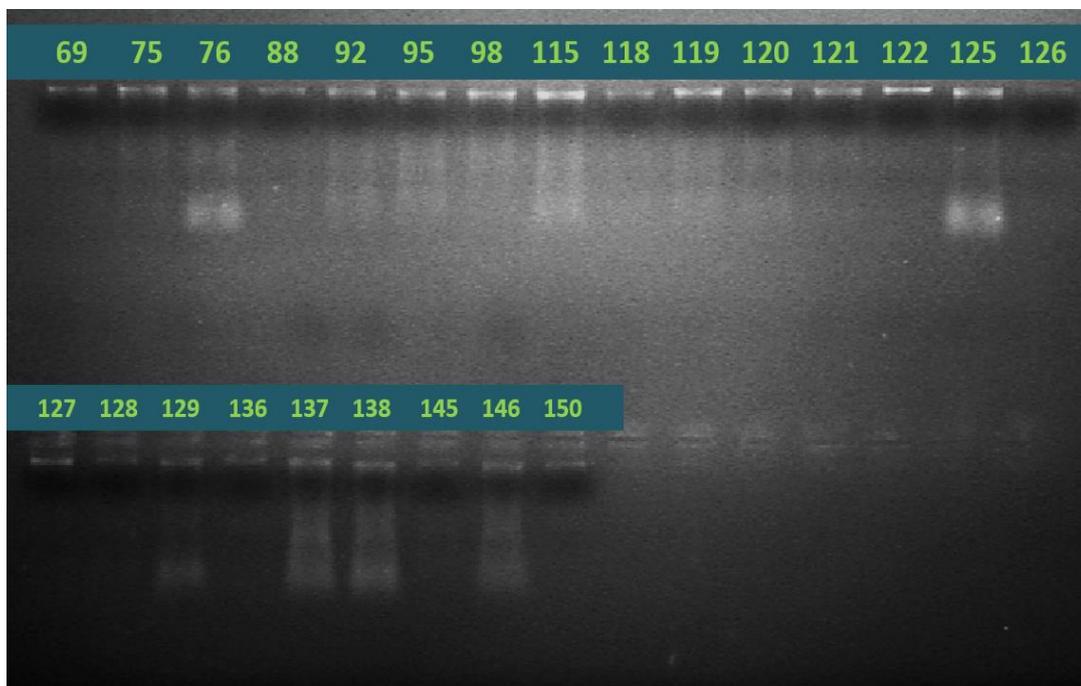
Ta- 169	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3351	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	yana tauri
Ta- 170	Dos de Mayo	Yanas	Barrio Independiente	3351	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	chocolate tauri
Ta- 171	Dos de Mayo	Yanas	Yanas	3378	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri blanco
Ta- 172	Dos de Mayo	Yanas	Yanas	3378	09°,56'.638	076° 12'.184	cultivado	tauri muro
Ta- 173	Huánuco	Kichqui	San Pedro de Cani	2799	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	tauri blanco
Ta- 176	Huánuco	Kichqui	Mayus	2822	09°,52'.632	076° 23'.315	cultivado	yuraj tauri
Ta- 177	Huánuco	Kichqui	Ascencio Loma	2777	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	chocho blanco
Ta- 178	Huánuco	Kichqui	Ascencio Loma	2692	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	yuraj tauri
Ta- 179	Huánuco	Kichqui	Ascencio Loma	2692	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	muro tauri
Ta- 180	Huánuco	Kichqui	Pampas	3286	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	chocho blanco mejorado
Ta- 181	Huánuco	Kichqui	Pampas	3286	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	chocho muro
Ta- 182	Huánuco	Kichqui	Pampas	3120	09°,52'.631	076° 23'.311	cultivado	chocho blanco mejorado

**ANEXO N°2:** Total de provincias, distritos y caseríos de colecta.

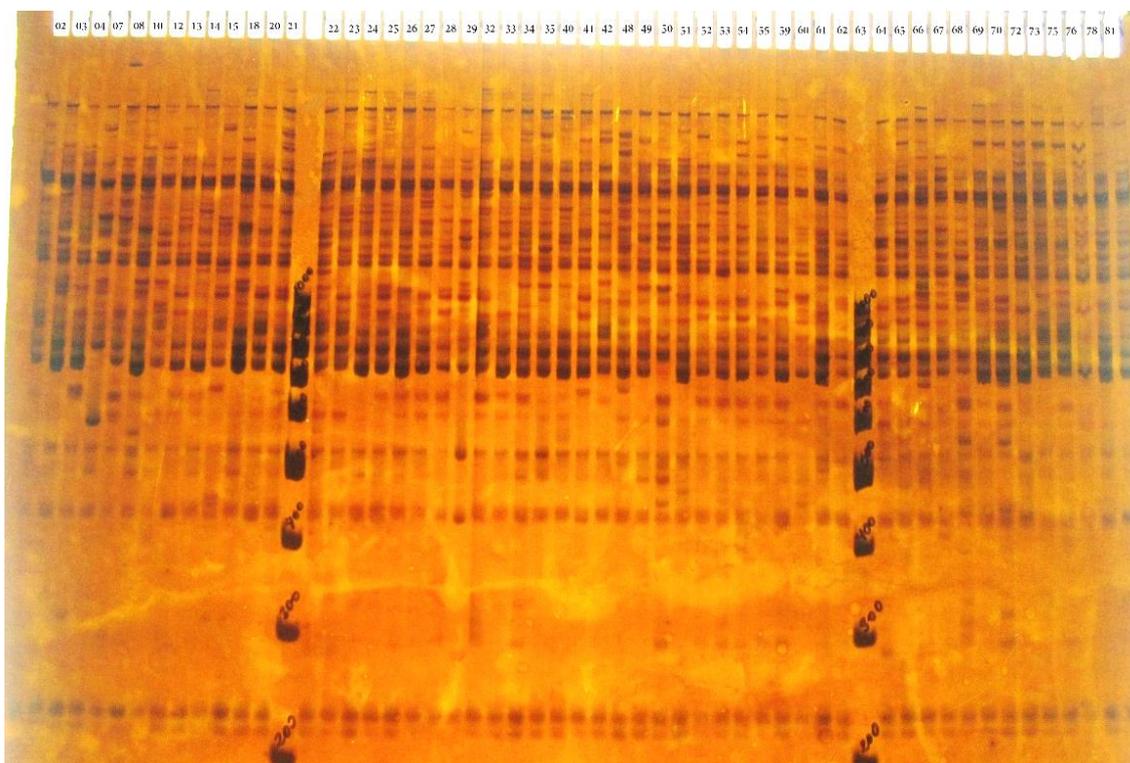
PROVINCIA	DISTRITO	CASERÍOS							TOTAL ACCESIÓN
<b>Pachitea</b>	Panao	Pulijaj	Tonapuco						18
	Umari	Illarumi	Pinkiray	Piñapampa					
<b>Huánuco</b>	Churubamaba	Vinchos	Gonya-vinchus		Conchabamba				29
	Amarilis	Macchi	Gayto	Ñaupamarca		Shishmay			
	Valle	Santa rosa de marambuco							
	Kichqui	Mayus	Ascencio lomas		Pampas	San pedro de cani			
<b>Ambo</b>	Tomayquichua	lucmas	chinchubamba						18
	Conchamarca	Colisragra	Huarqui	Keropaqui		Tayapampa			
<b>Huamalíes</b>	Puñus	Chupancancha	Bellapampa	Huamanchaca		Puñus			19
	Miraflores	Señor de mayo							
	Llata	Canchapampa							
<b>Yarowilca</b>	Obas	Shiris upianan	Gachgapampa	Obas	Shunquipampa	Jeccho	Umpash	Chillicsa huachanan	33
	Cahuac	Santa rosa de cachac		Cachac					
	Choras	Garu							
<b>Dos de mayo</b>	Pachas	Buenos aires	Nuñash	Parashapata					20
	Yanas	Jirkayacu	Yanas	Barrio independiente					
<b>6 Provincias</b>	<b>16 Distritos</b>	<b>45 Caseríos</b>							<b>137</b>

Fuente: Elaboración propia

**ANEXO N°3:** Gel de calidad de ADN de 24 accesiones de *Lupinus Mutabilis* S.



**ANEXO N°4:** Corrida electroforética en gel de poliacrilamida de las amplificaciones con el iniciador ISSR UCB 834 con 53 accesiones de tarwi.



**ANEXO N°5:** Preparación de reactivos para la fijación de geles con nitrato de plata.

#### Solución de fijación

Componentes	Concentración Stock	Para 1 litro	Concentración final
Etanol absoluto	100 %	100 ml	10 %
Ácido acético glacial	17 M	8 ml	0.1 M
Agua miliQ		Enrasar a 1 litro	

#### Solución de tinción

Componentes	Concentración Stock	Para 500 ml	Concentración final
Nitrato de plata	-	1 g	12 mM
Solución de fijación	-	500 ml	-

Para reutilizar la solución agregar 0.3 g de nitrato de plata

#### Solución de revelado

Componentes	Concentración Stock	Para 1 litro	Concentración final
NaOH	-	30 g	1M
Agua miliQ		1 litro	

Agregar antes de usar 2.4 ml de formaldehído por cada 900 ml de solución, si se reutiliza la solución agregar 1.5 ml de formaldehído.

Fuente: Sota (2012).

#### ANEXO N°6: Siglas y términos utilizados

Siglas:

- OTU (Unidad taxonómica Operacional)
- UPGMA (Media Aritmética No Ponderada)
- MDB (Matriz Básica de Datos)
- AMOVA (Análisis de Varianza Molecular)
- UCB ( Iniciadores ISSR)
- ISSR (Inter Secuencias Simples Repetidas o Intermicrosatélites)
- PIC (Índice de contenido Polimórfico)
- %P (Porcentaje de Polimorfismo)

Términos utilizados:

- **Accesión:** Muestra de una planta introducida y mantenida en un banco de germoplasma para su conservación o uso.
- **Iniciador:** Cadena de ácido nucleico que sirve como punto de partida para la replicación del ADN.
- **Dendograma:** Representación gráfica o diagrama de datos en forma de árbol.
- **Polimorfismo:** Existencia en una población de múltiples alelos de un gen.
- **Coeficiente de similitud:** Estadístico utilizado para comparar la similitud de dos muestras.
- **Índice de Jaccard:** Mide la similitud, disimilitud o distancias que existen entre dos estaciones de muestreo.
- **Fst:** Grado de diferenciación génica entre todos los individuos.

## **ANEXO N°7:** Imágenes de conducción y ejecución de la tesis

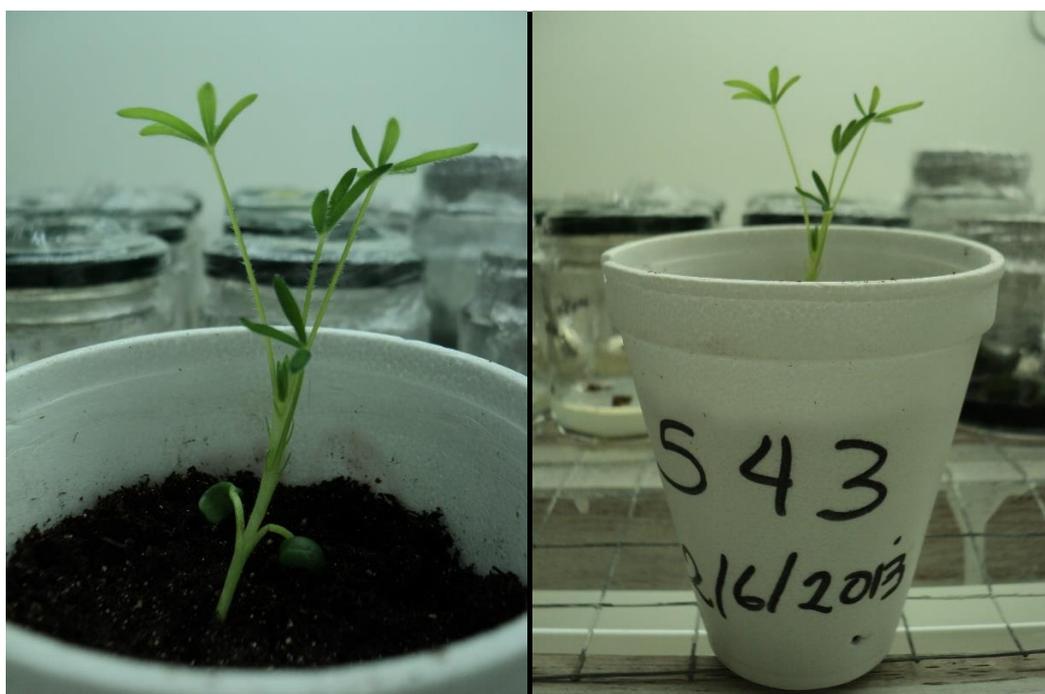
### A) Accesiones utilizadas



B) Siembra de las accesiones de tarwi en macetas



C) Plántulas de tarwi (Referencial)



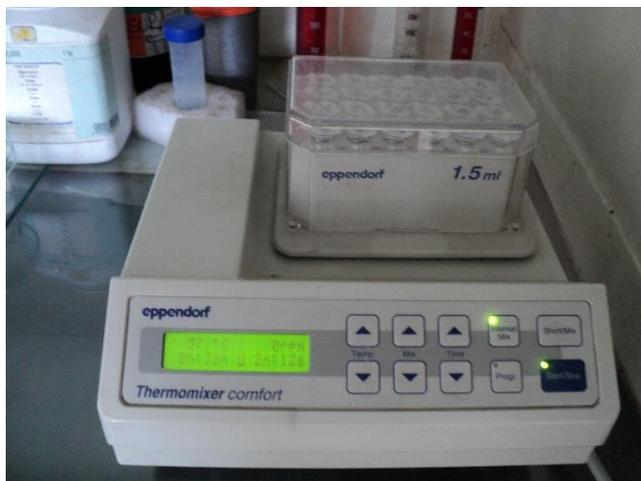
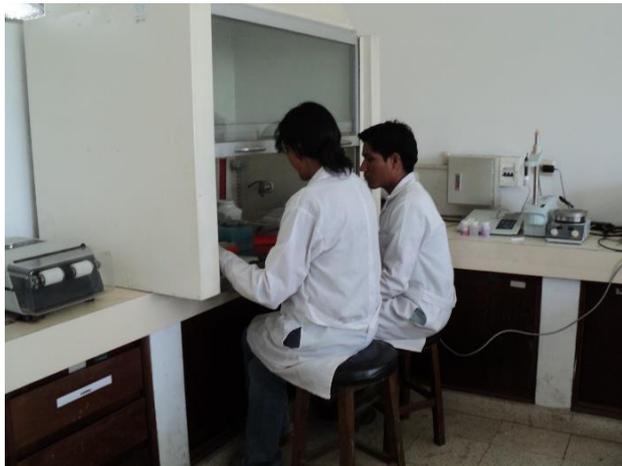
#### D) Preparación y secado de las hojas tarwi



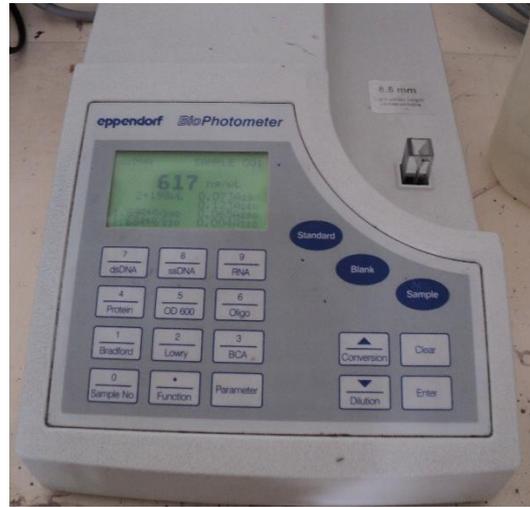
### E) Molido de muestras secas



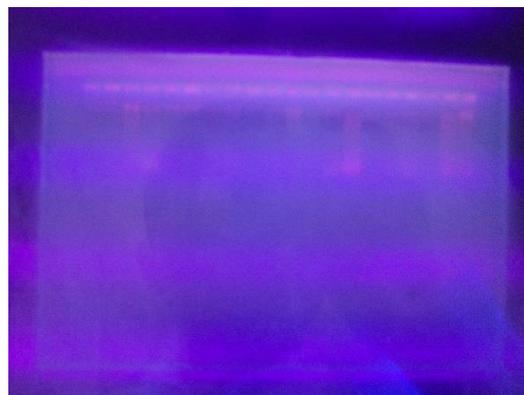
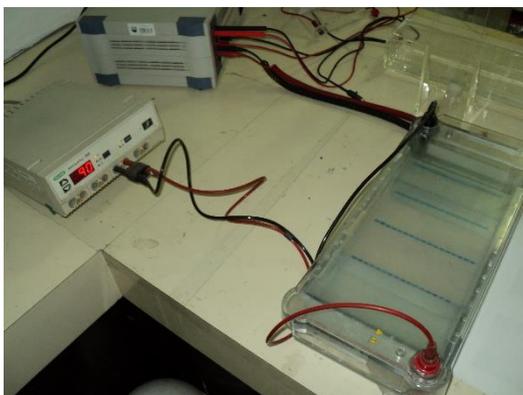
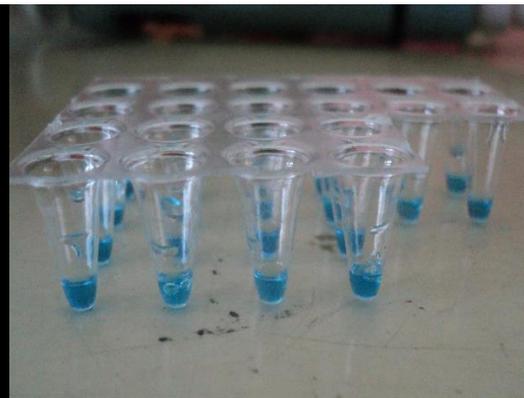
### F) Extracción de ADN



### G) Pureza y Cuantificación de ADN



### H) Calidad de ADN



## I) Diluciones



## J) Amplificación del ADN con ISSR



## K) Electroforesis en geles de Poliacrilamida

