

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA



**Determinación de la diversidad genética mediante
marcadores AFLPs en morfotipos de “papas nativas”
del distrito de Anco, provincia La Mar-Ayacucho,
2011.**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO**

CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD DE:

MICROBIOLOGÍA

PRESENTADO POR:

Bach. GAMBOA BENDEZÚ, Yuri

AYACUCHO-PERÚ

2013

DEDICATORIA

A Dios nuestro Señor siempre gracias por todo.

A mis amados padres, Misael y Lorgia, por sus valores, enseñanzas y consejos.

A mis hermanos, Chela, Marleny, Yeny, Jhans y Jhaziel por estar siempre conmigo.

A mis amados abuelitos, Francisco Bendezú y Zenobia Vargas, que desde el cielo me iluminan.

AGRADECIMIENTOS

A mi alma mater la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga por darme la oportunidad de alcanzar esta meta, y a todos mis maestros por compartir sus conocimientos y enseñanzas.

Al CONCYTEC, por el financiamiento del presente trabajo de investigación.

Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) sede Lima, especialmente a los miembros y amigos del Laboratorio de Biología Molecular, quienes permitieron la culminación de este trabajo.

A los productores de la papa nativa del distrito de Anco, que facilitaron las muestras para el dicho trabajo y contribuyen con el aporte de mantenimiento y conservación de esta diversidad.

Al Mg. Gilmar Peña Rojas, asesor del presente trabajo, por confiarme la responsabilidad de llevar a cabo el presente tesis, que apostó inquebrantablemente, y prestando todo su apoyo para que ésta tesis sea hoy una realidad.

A mi co-asesor Dr. Jorge Benavides Revilla, del INIA, por compartir sus conocimientos, orientaciones y oportunas sugerencias, para llevar a cabo el presente trabajo.

Al Blgo. Reynan Cóndor Alarcón, por la ayuda en el análisis estadístico.

Al Sr. Luis Gutiérrez Walhoff (CIP e IBT), por sus orientaciones y consejos.

ÍNDICE

	Pág.
Dedicatoria	ii
Agradecimientos	iii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
2.2. Papa nativa	3
2.2.1. Clasificación taxonómica	4
2.2.2. Diversidad de especie	4
2.2.6. Diversidad genética en papas nativas	6
2.3. Descripción botánica	8
2.4. Variabilidad genética	10
2.5. Caracterización molecular del genoma	15
2.5.2. Extracción de ADN genómico	15
2.6. Cuantificación y determinación de la calidad del ADN	17
2.6.1. Electroforesis	19
2.7. Endonucleasas de restricción	21
2.8. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	23
2.9. Marcadores moleculares	24
2.10. Determinación de la diversidad genética mediante AFLP	27
3.11. Análisis estadístico	33
III. MATERIALES Y MÉTODOS	44
IV. RESULTADOS	56
V. DISCUSIÓN	65
VI. CONCLUSIONES	75
VII. RECOMENDACIONES	76
VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
ANEXOS	85

Título: Determinación de la diversidad genética mediante marcadores AFLPs en morfotipos de “papas nativas” del distrito de Anco, provincia La Mar- Ayacucho, 2011.

Autor: Bach. Yuri Gamboa Bendezú

Asesor: Mg. Gilmar Peña Rojas

RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar la diversidad genética de morfotipos de papas nativas del distrito de Anco de la provincia La Mar de la región Ayacucho, se colectaron muestras de 38 morfotipos de papas nativas, los cuales fueron sembrados en el vivero de la ciudad universitaria - UNSCH. A partir del material vegetal de las hojas de dos a tres semanas se procedió a la extracción de ADN lográndose una buena calidad y cantidad. Para la técnica de AFLP se emplearon tres combinaciones de iniciadores: E38 – M61; E35 – M49 y E38 – M49, de las cuales se obtuvo en promedio 76 bandas polimórficas, estos datos fueron usados para generar un dendograma, utilizando el software NTSYS-pc 2.1. La mejor combinación se encontró en E38 – M49 que representó el 79,3 % de bandas polimórficas y un índice de contenido polimórfico (PIC) de 0,38. El análisis de agrupamiento según el algoritmo Unweigthed Pair-Group Meted Using Aritmetic Averages (UPGMA) presentó un dendograma con un índice de correlación cofenética r de 0,7. El dendograma generado a un coeficiente de similitud de 0,65 para Simple Matching agrupa a los morfotipos de papas nativas del distrito de Anco en cinco grupos genéticos diferentes. Sin embargo, a un coeficiente de similitud de uno no se encontró morfotipos duplicados. Se concluye que los papas nativas muestran diversidad genética utilizando el marcador AFLP.

Palabras clave: Diversidad genética, papas nativas, marcadores AFLP.

I. INTRODUCCIÓN

El Perú es uno de los mayores centros de germoplasma de especies domésticas de la flora y fauna del mundo y uno de los más importantes centros de especies silvestres de mayor utilidad (Morales y Bermúdez, 2001). La región andina constituye la mayor reserva genética mundial de raíces y tubérculos andinos (Terrazas y Valdivia, 1999). Las papas nativas crecen en los andes, especialmente el Perú y Bolivia en alturas que fluctúan entre los 3 000 a 4 000 m.s.n.m.

La diferencia fenotípica entre cultivares o morfotipos de papas nativas es mínima y no representa toda la diversidad de la especie; sin embargo, esta diferencia genética entre los mismos es muy grande y puede servir para formar grupos sobre la base de similitudes genéticas más reales. Así mismo, es fácil encontrar cultivares dentro de una misma especie con características diferentes, por lo que es necesario la caracterización de la diversidad con el análisis de variabilidad y distribución de los individuos que conforman las poblaciones para contribuir en los estudios de inventario y estrategias apropiadas de selección y conservación de la diversidad cultivada (Roca y Manrique, 2005). Por lo tanto, utilizando el marcador molecular AFLP (polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados) se puede realizar estudios de diversidad genética porque presenta

las siguientes ventajas: 1) que no se requiere un conocimiento previo del genoma; 2) tiene mayor eficiencia (número de bandas/reacción); 3) las regiones que se analizan se encuentran distribuidas por todo el genoma; y 4) que presentan alta reproducibilidad (Torres y Moreno, 2001). En este sentido, el AFLP constituye una herramienta valiosa para la determinación de la diversidad genética por ser un método poderoso para generar una huella digital o "fingerprinting" que es reproducible a partir de cualquier muestra de ADN.

Por las consideraciones señaladas, el presente trabajo pretende contribuir en la caracterización de las papas nativas y el AFLP nos permitirá determinar con mayor precisión la diversidad genética de "papas nativas" del distrito de Anco, de la provincia de La Mar, de la región Ayacucho. El objetivo general del trabajo de investigación consistió en determinar la diversidad genética en morfotipos de "papas nativas" mediante marcadores AFLPs del distrito de Anco, provincia La Mar - Ayacucho, 2011. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- ✓ Determinar la mejor combinación de "primers" que determinen mayor polimorfismo en las papas nativas.
- ✓ Determinar la existencia o no de morfotipos duplicados de papas nativas.
- ✓ Determinar los grupos genéticos de papas nativas.

II. MARCO TEÓRICO

2. 1. PAPA NATIVA

Graham y Bernet (2005) señalan que las papas nativas crecen en los andes, especialmente el Perú y Bolivia, en alturas que fluctúan entre los 3 000 a 4 000 m.s.n.m. Las variedades de papas nativas, a diferencia de las variedades mejoradas, son producto de siglos de domesticación del cultivo de la papa llevado a cabo por los antiguos peruanos.

Túpac (2001) señala que las papas nativas deben ser consideradas como un cultivo diferente al de las papas mejoradas. Y que representa mejor calidad culinaria y alto porcentaje de materia seca. Además de sus extraordinarias cualidades nutritivas, las papas nativas destacan por su diversidad extraordinaria de formas, tamaños, colores de cáscara y de pulpa, sabores y textura. Las pulpas son blancas, amarillas, rojas, azules, naranjas, moradas y en muchos casos forman combinaciones vistosas y únicas (Ordinola y Col., 2007). La papa nativa tiene un comportamiento estacional a escala nacional, con un pico productivo entre los meses de febrero y marzo, y otro de julio a setiembre, periodos en los que se obtiene 55 % de la producción; el 45 % restante se reparte entre marzo y junio (25 %) y octubre y diciembre (20 %), (Fuentes y Col., 2009). Por lo tanto, es necesario optimizar la presentación comercial de las

papas nativas, poniendo énfasis en el cuidado de la cosecha, poscosecha y conservación del producto (Devaux y Thiele, 2002).

En la región de Ayacucho entre los años 1947 a 1997 se registró 421 diferentes variedades de papas cultivadas, registrados en las provincias de Huamanga, Lucanas, Parinacochas, Paucar del Sara Sara, La Mar, Huanta, Víctor Fajardo y Vilcashuamán, siendo las provincias con mayor número de variedades registradas: Paucar del Sara Sara con 86 variedades, seguidas de la provincia de La Mar con 78 variedades (Ochoa, 2003).

2. 2.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	: Antophyta
Clase	: Dicotyledoneae
Subclase	: Metaclamideae
Orden	: Tubiflorales
Familia	: Solanaceae
Género	: Solanum
Especie	: <i>Solanum sp.</i>
N.C.	: "Papa nativa"

Fuente: Engler, 1892. Citado por Mostacero y Mejía, 1993.

2.2.2. DIVERSIDAD DE ESPECIE

Existen diferentes puntos de vista en cuanto al número de especies de papa cultivada, la taxonomía formal de Ochoa (1999), reconoce nueve especies; Hawkes (1990), siete especies y subespecies; Huamán y Spooner (2002), una especie con ocho grupos taxonómicos. El Centro Internacional de la Papa (CIP,

2006) comúnmente considera la clasificación de ocho especies cultivadas, como muestra la Tabla N° 01.

Tabla N° 01. Especies de papas con sus respectivas ploidías.

Espece	Subespece	Ploidía
<i>Solanum tuberosum</i>	<i>tuberosum</i>	2n=4n=48
	<i>andigena</i>	2n=4x=48
<i>Solanum goniocalyx</i>	-	2n=2x=24
<i>Solanum stenotomum</i>	-	2n=2x=24
<i>Solanum chauca</i>	-	2n=3x=36
<i>Solanum phureja</i>	-	2n=2x=24
<i>Solanum juzepczukii</i>	-	2n=3x=36
<i>Solanum curtilobum</i>	-	2n=5x=60
<i>Solanum ajanhuiri</i>	-	2n=2x=24

Fuente: CIP, 2006

La biodiversidad de estas especies presenta un desarrollo desigual, con marcadas diferencias regionales. Algunas son conocidas en el ámbito nacional y su consumo es difundido. Otras tienen sólo presencia regional. La mayor parte son desconocidas y corren riesgo de erosión (Yamamoto, 1988).

Las variedades más conocidas son las amarillas, entre ellas la duraznila (o puca duraznila), runtus, peruanita y tumbay; y las huayros, entre ellas uccu huayro, yuracc huayro y runtu huayro. Estas tienen un mercado dinámico y estable en Lima, a pesar que normalmente cuesta el doble que las otras papas. Las variedades de presencia regional y de marcada preferencia de los consumidores son ccompis en Andahuaylas, Cusco y Puno (Yamamoto, 1988). Sin embargo, la mayoría de las variedades son desconocidas, y aunque no es posible evidenciar su erosión, sí es posible constatar el estancamiento de la producción y un peligro

latente de desaparición, incluso se cree que algunas, como la *Solanum hygrothermicum*, se han perdido (National Research Council, 1989; CIP - IDEAGRO, 2001). Se señalan como causas factores adversos al medio ambiente, recursos tecnológicos insuficientes, y la precariedad económica y social de sus cultivadores. No obstante, hay pocos estudios que permitan conocer la real situación a fin de determinar las estrategias para contribuir a la conservación de esta biodiversidad. El presente estudio del caso de las papas nativas se ubica en este contexto (CIP - IDEAGRO, 2001).

2.2.3. MORFOTIPO

Un morfotipo está formado por plantas que son similares morfológicamente; muestran el mismo fenotipo pero no necesariamente son de la misma constitución genética. La estructura genética de las especies que se reproducen vegetativamente depende de la forma como se reproducen sexualmente (INIA, 2006).

2. 2. 4. PAPA SILVESTRE

INIA, (2006) señala que son aquellas papas, que nunca fueron seleccionadas ni cultivadas. Debido a que las poblaciones o especies silvestres crecen y desarrollan en la naturaleza sin la intervención del hombre, hay individuos o poblaciones con genes particulares adaptados a las condiciones ambientales y de resistencia a pestes propias de la región.

2. 2. 5. DIVERSIDAD GENÉTICA EN PAPAS NATIVAS

La diversidad genética de las papas nativas hace que las mismas se adapten según cada uno del agro ecosistema en los cuales han sido colectadas y/o domesticadas. Esta adaptación tiene que ver con los atributos agronómicos y

mecanismos fisiológicos que expresa la planta para tolerar diferentes tipos de estrés, entre ellos el estrés por temperatura (Gutiérrez, 2008).

La diversidad de una especie está constituida por todas las variaciones genéticas, producto de la diferencia de las especies. La variación entre poblaciones de una especie, pero la variación dentro de poblaciones es la diversidad genética total de una especie (INIA, 2006).

La diversidad genética se manifiesta en la variedad de alelos y genotipos presentes en una población, especie o grupo de especies y se describe de varias formas, como polimorfismo (que estima la proporción de loci con varias formas alélicas) heterosigosidad o frecuencia promedio de individuos heterocigotos en cada locus (que estima la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de la población sean diferentes) y diversidad alélica (que estima el número de alelos promedio por loci), si los valores en estos parámetros son bajos, existe en la población poca variación y diversidad genética, y ello puede afectar la evolución y conservación de poblaciones pequeñas (con número reducido de individuos, restringidas, endémicas) y geográficamente aisladas, ya que pueden ocasionar: 1) reducción del potencial evolutivo por fijación de alelos, 2) consanguineidad severa como resultado del apareamiento entre parientes, 3) cambios en la frecuencias alélicas que no necesariamente son resultados de cambios adaptativos por efecto de deriva génica y 4) reducción en su capacidad de adaptarse a cambios ambientales vía selección natural (Frakham y Col., 2004).

El gran reto consiste en preservar esta valiosa diversidad en favor de todos: productores, consumidores e investigadores. Es fundamental contar con

mercados específicos para que estas papas sigan siendo cultivadas en los campos alto andinos (Alvarado, 2008).

2. 3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La planta de la papa (*Solanum sp.*) es una hierba perenne, pero en la agricultura es utilizado como un cultivo anual (Figura N° 1) (Vreugdenhil, 2007).

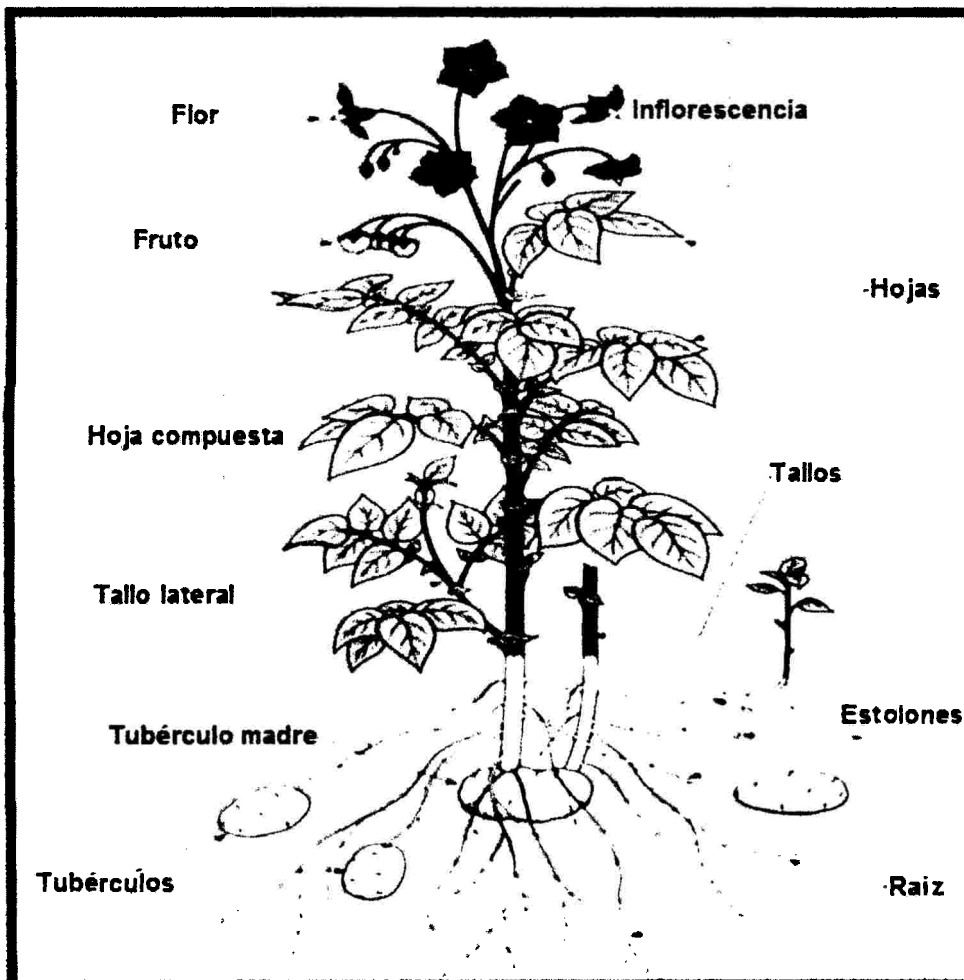


Figura N° 1. Esquema de la planta de la papa y sus partes (CIP, 2010).

2. 3.1. EL TALLO

La planta de papa es un conjunto de tallos aéreos y subterráneos (Egusquiza, 2000).

2. 3. 2. LA RAÍZ

La raíz es la estructura subterránea responsable de la absorción del agua. Se origina en los nudos de los tallos subterráneos y en conjunto forma un sistema fibroso (Egusquiza, 2000).

2. 3. 3. LA HOJA

La hoja es la estructura que sirve para y transformar la energía lumínica (luz solar) en energía alimenticia (azúcares y almidón). Las hojas maduras son compuestas y consisten en un foliolo con un peciolo con un foliolo terminal, folíolos laterales, folíolos secundarios (Egusquiza, 2000).

2. 3. 4. LA FLOR

Es la estructura aérea que cumple funciones de reproducción sexual. Desde el punto de vista agrícola, las características de la flor tienen importancia para la diferenciación y reconocimiento de variedades. Las flores se presentan grupos que conforman la inflorescencia cuyos elementos se muestran a continuación (Egusquiza, 2000).

2. 3. 5. FRUTOS Y LA SEMILLA

El fruto o baya de la papa se origina por el desarrollo del ovario (Egusquiza, 2000).

2. 3. 6. EL ESTOLÓN

El estolón es un tallo subterráneo que se origina en la yema del tallo subterráneo. El extremo del estolón tiene la forma de "gancho". Es un tallo especializado en el transporte de las sustancias producidas en las hojas y que se almacenan en el tubérculo en forma de almidones (Egusquiza, 2000).

2. 3. 7. EL TUBÉRCULO.

Es la porción apical del estolón cuyo crecimiento es fuertemente comprimido y orientado hacia los costados (expansión lateral). El tubérculo de las papa es el tallo subterráneo especializado para el almacenamiento de los excedentes de energía (almidón) (Egusquiza, 2000).

2. 3. 8. TIPOS DE REPRODUCCIÓN

2. 3. 8. 1. Reproducción asexual

Por reproducción asexual (reproducción vegetativa) o mitosis se obtiene una progenie genéticamente idéntica a su único progenitor. La propagación de la papa mediante tuberculos-semilla es un ejemplo excelente de la reproducción asexual. Un grupo de plantas derivadas de una sola célula progenitora por división mitótica se llama clon. Por consiguiente, un clon consiste en un grupo de plantas genéticamente idénticas (Estrada, 2000).

2. 3. 8. 2. Reproducción sexual

Según Estrada (2000) comprende dos divisiones nucleares que producen un total de cuatro núcleos, cada uno de los cuatro núcleos contiene la mitad del número de cromosomas del núcleo original. Las células producidas por meiosis contiene combinaciones completamente nuevas de cromosomas, la característica más importante de la reproducción sexual es la creación de una variabilidad genética creada por los principios básicos de la meiosis, que no se encuentran en la mitosis.

2.4. VARIABILIDAD GENÉTICA

La variación genética resulta de cambios en secuencia del ADN y es la base para la evolución. En el caso más simple, la variación en secuencia del ADN

dará lugar a la variación en secuencia de aminoácido de la proteína codificada por ese gen (Vermerris y Gainesville, 2008).

2.4.1. ORIGEN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Las mutaciones que ocurren al azar a lo largo de millones años son la fuente última de la variabilidad genética de las poblaciones de organismos que existen hoy en día. Sin embargo, la variabilidad genética de una generación a la siguiente, de una especie, depende de la meiosis (Audesirk y Col., 2004). Los biólogos evolutivos proponen que los genes estructurales existentes actualmente tuvieron sus comienzos en muy pocos protogenes, que se duplicaron y modificaron por acumulación de mutaciones los últimos 4 000 millones de años. Más importante aún es que existen evidencias claras de que este proceso de duplicación y subsiguiente mutación continúa en el presente (Passarge, 2010).

2.4.2. TIPIFICACIÓN GENÉTICA DE COLECCIONES DE PAPA.

En 1997, el CIP informó sobre el primer uso de marcadores moleculares para tipificar una colección completa de papas cultivadas. El objetivo de este trabajo fue evaluar la diversidad genética de la colección y seleccionar una muestra representativa que comprenda una amplia variedad genética.

2.4.3. IMPORTANCIA DEL MANTENIMIENTO DE LA VARIABILIDAD

La existencia de la variabilidad es necesaria para que siga habiendo progreso en agricultura. Teniendo en cuenta que con una agricultura desarrollada la evolución de plantas cultivadas tienen lugar solamente en manos del mejorador el mantenimiento de la variabilidad genética es la única posibilidad del cambio para el futuro (Cubero, 2003)

2.4.4. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE PAPAS UTILIZANDO MARCADORES MOLECULARES AFLPs.

Al analizar la diversidad genética de *Solanum sp.* "papas nativas" del distrito Chungui - Ayacucho, empleando tres combinaciones de iniciadores del AFLP, en la cual se obtuvo 85 bandas de las tres combinaciones, las cuales fueron leídas en un rango de 240 a 100 pb de las cuales el 73,8 % fueron polimórficas. Siendo la combinación E38 - M49 con el mayor porcentaje de 79,4 %. Los valores del PIC fueron 0,30, 0,38 y 0,43 para las combinaciones E38 - M49, E35 - M49 y E37 - M50 respectivamente de (Gonzales, 2011).

Al evaluarse la diversidad genética de 64 cultivares de papa resistente a virus (16 fueron de china y 38 provenientes del CIP), empleando para ello el uso de 12 combinaciones de iniciadores del AFLP, de los cuales la mayoría de los cultivares tuvieron poca distancia genética muy corta inclusive entre los cultivares de papas propios de china y los proveniente de CIP, en algunos casos los cultivares tuvieron mayor distancia genética, estos resultados a saber la distancia genética estuvieron en el rango de 0,041 a 0,391 del análisis del dendograma se obtuvo que los coeficientes de similitud genética estuvieron entre el rango de 0,68 (Fang y Col., 2011).

En el estudio de diversidad genética de papas cultivadas en Turquía se encontró una diversidad genética en todas las accesiones. Se empleó seis combinaciones de iniciadores AFLP con lo que se obtuvo 264 bandas de estas solo 191 fueron claramente diferenciadas. El número de bandas polimórficas por iniciador van desde ocho a 45 bandas polimórficas haciendo una media de 31,5 bandas. La distancia genética máxima entre accesiones fue de 0,55 y la distancia genética mínima fue de 0,13. Las 26 accesiones fueron agrupadas en seis grupos, el

contenido de la información polimórfica (PIC) van entre 0,04 a 0,96 con una media de 0,56 (Akkale y Col., 2010).

En el estudio de la diversidad genética de papas de América del Norte y de Europa cultivadas en Irán mediante el uso de AFLP, en el análisis de los grupos se encontró una gran diversidad genética, reportando al acceso de código 676079 la cual presentó una distancia genética de 0,97 con respecto a los demás grupos. Los valores de PIC oscilan entre 0,48 y 0,723 con una media de 0,606. El rango de la variación de la similitud genética varió ligeramente en su estudio, variando desde 0,697 a 0,881 (Saeed y Col., 2009).

En el estudio de la diversidad genética de 19 variedades de papa, en China. Mediante el uso del AFLP, donde se empleó siete combinaciones de primers, en la cual mostraron un total de 495 bandas, entre ellas 302 bandas fueron polimórficas y 54 ~ 90 bandas fueron ampliadas en cada carril. El análisis del AFLP indican la distancia genética fue entre 0,2091 ~ 0,7679 de los 19 variedades de papa y el valor promedio fue 0,4811. Cuando todas las bandas polimórficas se analizaron mediante análisis de clúster, 19 cultivares fueron clasificados en cuatro grupos. El nombre dos grupos incluyen 14 variedades de papa, que representaron 73,68 %. El análisis demostró que existía una estrecha progenie entre la mayoría de variedades de papa, y la distancia genética entre las variedades de las minorías y los demás. Además, este estudio demuestra que AFLP impresión de huellas digitales tiene mayor resolución y es más adecuado para el estudio de la diversidad de variedades de papa (Li y Col., 2007).

En el estudio de la diversidad genética de análisis de algunas variedades de papa cultivadas en China, utilizando marcadores AFLP. En 79 variedades de

papa, empleando ocho combinaciones de cebadores, donde se obtuvieron un total de 801 bandas, y el número promedio de bandas por carril fue de 100,13 de las cuales 493 bandas fueron polimórficas. La tasa media de polimorfismo certificado fue 61,2 %. El polimorfismo más alto fue con la combinación de los iniciadores E11 – M51. Donde las accesiones se clasificó en tres grupos de acuerdo al análisis de agrupamiento de clústeres. No hubo diferencia obvia en relación geográfica entre la agrupación resultante. Además, las accesiones de papa, se podría certificar mediante marcadores moleculares AFLP (Di y Col., 2006).

En su trabajo de investigación “Descripción molecular y las relaciones de similitud entre germoplasma de papa nativa *Solanum tuberosum* L. utilizando los datos morfológicos y los marcadores AFLP” encontró una baja correlación entre las características morfológicas y moleculares (AFLP) con un dendograma de $r = -0,09$ en la evaluación de biodiversidad genética de papas nativas cultivadas en Chile (Solano y Col., 2007).

En su trabajo de investigación “La estimación de la variación genética y una relación de la papa *Solanum tuberosum* L. donde hasta 84 bandas polimórficas fueron detectados con un iniciador de combinación entre 12 accesiones. Los siete combinaciones generó un total de 466 bandas, de las cuales 409 (88 %) fueron polimórficas claramente entre los cultivares. Se midió la presencia o ausencia de cada marcador de AFLP y se emplearon los análisis filogenéticos y de distancia genética para generar dendogramas que mostraran las relaciones genéticas entre los cultivares evaluados. El análisis basado en fragmentos de ADN amplificados no siempre reflejó las relaciones genéticas conocidas entre los cultivares. Estos resultados demuestran que los marcadores de ADN del AFLP pueden tener un gran valor en la identificación y medida de la variación pero

deberán usarse con cautela para estimar las medidas reales de la similitud genética en la papa (Kim y Col., 1998).

2. 5. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GENOMA

2. 5. 1. Colecta de material biológico

Para llevar a cabo el análisis con huellas genómicas de las plantas, es necesario considerar los siguientes pasos:

1. Seleccionar material vegetal sano (por ejemplo, las mejores hojas u otro tipo de tejido verde) completamente libre de infecciones visibles (lesiones).
2. Limpiar o lavar suavemente la superficie del tejido con etanol a 70 %.
3. En principio, es mejor utilizar material fresco para las técnicas de huellas de ADN (Valadez y Kahl, 2005).

2.5.2. EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

a) Solubilización de las membranas

Se emplea un detergente con el propósito de liberar el contenido nuclear y disociar la membrana celular. Un procedimiento que presenta algunas modificaciones para resolver problemas específicos de especies con gran contenido de metabolitos secundarios con el método que utiliza un detergente catiónico CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide) de carga positiva, muy adecuado para el aislamiento de ADN de alto peso molecular, el cual se pega fuertemente al ácido nucleico, desplazando la proteína previniendo la degradación del mismo. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en fase acuosa listo para ser precipitado con etanol (Valadez y Kahl, 2005).

El CTAB utiliza un sistema Tris: HCl pH 8,0 para mantener el pH constante; este además de solubilizar las membranas lipoproteínas, dependiendo de la concentración de NaCl forma un complejo con el ADN, y por lo tanto, puede ser utilizado para precipitar el mismo selectivamente en presencia de alcohol. La concentración utilizada de NaCl en el tampón de extracción es de 1,4 M, siendo esta necesaria para la solubilidad y la acción del CTAB.

Otro tipo de detergente aniónico es el SDS (sulfato dodecil de sodio), este tiene la capacidad adicional de desnaturalizar proteínas globulares en sus subunidades (Lee y Col., 2001); siendo las enzimas la mayor parte de este tipo de proteínas. También se puede incluir este detergente en el tampón sin excluir el CTAB, ya que puede usarse en el mismo protocolo (Dellaporta y Col., 1983).

b) Inhibición enzimática

El ADN debe ser protegido de la acción degradativa de las enzimas (nucleasas) o compuestos secundarios liberados con la rotura de las células. Por eso se utilizan componentes esenciales de las soluciones de extracción. Un acomplejante de los cofactores enzimáticos es el EDTA (Ethylen diamin tetra acetato), un quelante por excelencia que capta cationes divalentes tales como Mg^{2+} y Ca^{2+} (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La mayor parte de las enzimas quedaran inhibidas bajo condiciones de un pH que no sea el adecuado para las enzimas degradativas como las DNAsas, que tienen un pH óptimo de siete. El tampón de extracción utilizado este trabajo tiene un pH entre 8,0 y 9,0. La forma de inhibir las actividades enzimáticas es usando temperatura no óptima para la acción de las enzimas eucarióticas como la temperatura de inhibición de 65 °C, que además de facilitar la homogenización permite solubilizar las membranas como el detergente. Otra

forma es utilizar un agente reductor como el β -mercaptoetanol, que protege al ADN de las peroxidasas y polifenoloxidasas (Ferreira y Grattapaglia, 1998). También las proteínas se desnaturalizan totales al añadir a la muestra un agente reductor como el DTT o el β -mercaptoetanol. De esta manera, los puentes de disulfuro, se rompen y los polipéptidos se convierten en cadenas simples (Cubero, 2003). Se utilizan en algunos protocolos como la proteína K para inhibir o destruir completamente a las nucleasas, en caso de que se presenta una gran actividad de estas enzimas como se ha reportado para leguminosas (Zhang y Col., 2000).

c) Complejos de ADN

El CTAB junto con iones Na^+ forma un complejo con el DNA estabilizándolo y protegiéndolo de ataques enzimáticos y/o químicos (Dellaporta y Col., 1983).

d) Combatiendo los subproductos

Una concentración elevada de NaCl junto con el CTAB permite en los pasos iniciales la limpieza de polisacáridos, un componente importante que se adiciona al tampón de extracción es el PVP (polyvinylpyrrolidona), un polímero (Cheng y Col., 1997), que tiene efecto antioxidante para reducir el efecto indeseable de la oxidación de compuestos fenólicos como taninos, quinonas y polifenoles (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El uso de β -mercapetanol, es un agente antioxidante, que inactiva proteínas por reducción de los puentes de disulfuro (Sambrook y Col., 2001).

2.6. CUANTIFICACIÓN Y DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD DEL ADN

Varias son las técnicas utilizadas en la cuantificación del ADN. La opción por uno u otro método depende básicamente de la condición del laboratorio. Dos

técnicas bastante utilizadas en la cuantificación del ADN para análisis de AFLP, RFLP, y RAPD son las realizadas mediante un fluorímetro o por comparación de los fragmentos en geles coloreados con bromuro de etidio. Otra técnica bastante sencilla, utilizada en la cuantificación de ADN es el análisis comparativo de muestras coloreadas con bromuro de etidio en geles de agarosa. La técnica consiste simplemente en la utilización de una secuencia ascendente de concentraciones de solución patrón de ADN coloreadas lado a lado en el gel de agarosa, con el que se compara una muestra de DNA de concentración desconocida. El cálculo de las concentraciones de las bandas se hace bajo la luz ultravioleta según la fluorescencia. Esta variación es el más adecuado para la cuantificación, pues ocurre la separación del ADN y del ARN durante la electroforesis y se reduce la imprecisión del proceso de cuantificación cuando el ácido nucleído analizado presenta contaminantes que se unen al bromuro de etidio (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

La visualización del ADN se hace directamente en un gel de agarosa que contiene bromuro de etidio, las moléculas de esta sustancia se colocan entre las bases del ADN y producen una fluorescencia de color anaranjado bajo la luz ultravioleta, la señal emitida es proporcional a la cantidad de ADN en la muestra.

Para la determinación de la calidad del ADN se precisa la observación de bandas íntegras que corresponde a un ADN no degradado y en caso contrario cuando se observa un barrido (smear) este corresponde a un ADN degradado de mala calidad, no apto para su utilización en diversas técnicas moleculares.

El cálculo de la concentración de ADN se realiza mediante la observación de la fotografía del gel en presencia de la luz UV. Una cuantificación más precisa, se realiza comparando la intensidad de la banda con la primera banda del marcador

de peso molecular (ADN del fago lambda λ cortado con la enzima PstI), cuyo tamaño es de 14800 pb y su intensidad corresponde a una concentración de 280 ng/uL (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

2.6.1. ELECTROFORESIS

La electroforesis es una técnica de separación de moléculas en una mezcla por aplicación de un campo eléctrico. Las moléculas disueltas se desplazan o migran a una velocidad determinada por su relación carga-masa (Lodich y Col., 2005). Los materiales para la matriz más utilizados en la electroforesis son la poliacrilamida, la agarosa. Los geles de agarosa y poliacrilamida pueden prepararse en una variedad de formas, tamaños y porosidades y pueden ser corridos en varias configuraciones diferentes. Las elecciones de estos parámetros depende principalmente del tamaño de fragmentos que se van a separar (Freifelder, 1991).

a) Electroforesis en geles de agarosa

La electroforesis en geles de agarosa es un método simple y eficiente para la separación, identificación y purificación de fragmentos de ADN de varias longitudes. Los geles estándar de agarosa separan y resuelven fragmentos de 0.1 a 25 kb. (Valadez y Kahl, 2005).

b) Electroforesis en geles de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida (PAA) se utilizan principalmente para separar fragmentos de ADN de bajo peso molecular (de 50 a 1000 pb), como son los productos de reacciones de amplificación o productos de digestión con enzimas de restricción que requieran de una mayor definición, respecto a la obtenida en

geles de agarosa. Dependiendo de la longitud de producto a separar, la concentración de poliacrilamida puede ser variable (Valadez y Kahl, 2005).

La poliacrilamida es un soporte empleado frecuentemente en electroforesis en gel, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Además, son geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Los geles más finos son más económicos porque emplean menos reactivos y pueden ser eficientemente refrigerados durante la corrida, por lo tanto pueden ser corridos a mayor voltaje, lográndose así una alta resolución en corto tiempo. Los tiempos de tinción y distinción son menores también porque la difusión es muy rápida; sin embargo, como el gel es tan fino es más propenso a perturbaciones y problemas en la polimerización (Starr, 1997).

b.1) Formación del gel de poliacrilamida

Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización vinílica del monómero acrilamida $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$ y del monómero entrecruzado N,N-Metilenbisacrilamida: $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$. La polimerización se inicia con la formación de radicales libres del monómero, que se producen por radicales libres de oxígeno, por causa de la acción de iones persulfato. Las aminas terciarias como el N,N,N,N'-tetrametilendiamina (TEMED) se emplean como catalizadores de esta reacción, porque causan la formación de radicales libres del persulfato. Hay muchos factores que desempeñan una función importante en la separación electroforética, como son pH, fuerza iónica, gradiente de potencial, tiempo de corrida, concentraciones de acrilamida y bisacrilamida, etc. Las condiciones óptimas de una buena separación, en la

práctica se determinan experimentalmente con el análisis de cómo influyen los diferentes factores en la electroforesis en cuestión. La naturaleza de la muestra sirve de guía para alcanzar las condiciones en la que se deben obtener los mejores resultados. Reporta que durante la polimerización del gel a temperaturas inferiores a 17 °C, la iniciación del control catalítico y el tiempo de elongación de la cadena comienzan a ser diferencialmente controlables (Bambeck, 1890).

2. 7. ENDONUCLEASAS DE RESTRICCIÓN

Las endonucleasas de restricción se encuentran en las bacterias como parte de un mecanismo que utilizan para degradar al ADN extraño (exógeno). Son proteínas que se pegan particularmente a la doble cadena del ADN y la rompen en sitios específicos. Esta clase de enzimas se ha clasificado en tres categorías principales, cada una de ellas con características particulares (Valadez y Kahl, 2005).

- ✓ **Tipo I (clase I):** Son endonucleasas de restricción compuesta de tres subunidades (R, restricción; M, metilación; S, secuencia de reconocimiento) y exhiben tanto funciones de restricción como de modificación. Este tipo de enzimas requiere Mg^{2+} , ATP y S-adenosil metionina, cortan solo una cadena de las dos que conforman al ADN a una distancia de 1 a 5 kb a partir del sitio de reconocimiento. El rompimiento de la segunda cadena se lleva a cabo por una segunda enzima. Ejemplo. La enzima EcoB (Valadez y Kahl, 2005).
- ✓ **Tipo II (clase II):** La mayoría de las enzimas que se utilizan en la tecnología de ADN recombinante pertenecen a este grupo. Ellas reconocen secuencias particulares de bases nitrogenadas que consisten de tetra-, penta-, Hexa-, hepta-, u octanucleotidos llamado “palíndrome” con un eje de simetría

rotacional, ejemplo, la enzima EcoRI reconoce la siguiente secuencia: en la (Figuras N°2 a y 2 b) (Valadez y Kahl, 2005).

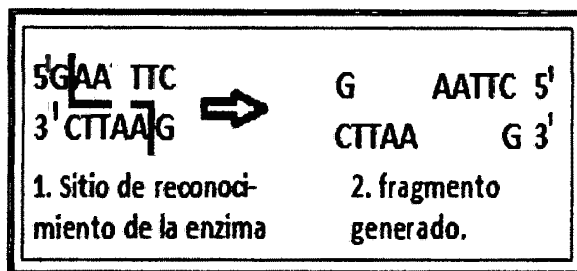


Figura N°2a. Corte específico del ADN, por la endonucleasa de restricción EcoRI. (Passarge, 2010)

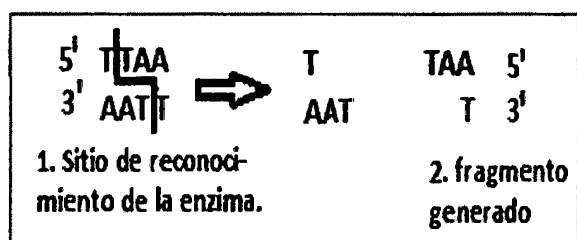


Figura N°2b. Corte específico del ADN, por la endonucleasa de restricción MseI. (Adaptada de: DFP – UFV. 2004)

Notar que el orden de las bases nitrogenadas en este palíndromo es el mismo en dirección 5' - 3' de la cadena de arriba comparado en el mismo sentido en la cadena de abajo. La unión de la enzima al ADN es muy íntima para facilitar el reconocimiento de las bases y después que esto ha ocurrido, la enzima se disocia. Algunas enzimas cortan exactamente en el eje de simetría, generando fragmentos de ADN con extremos romos o "rasurados". Otras enzimas rompen la cadena en lugares similares o en sitios opuestos del eje de simetría, creando fragmentos que llevan extremos protuberantes o salientes al final de la cadena sencilla (Valadez y Kahl, 2005).

- ✓ **Tipo III (clase III):** Son Endonucleasas de restricción compuestas de dos subunidades, reconocen una secuencia asimétrica estrecha, se pegan y catalizan el corte a una distancia de 24 a 26 pb con una reacción que

requiere ATP, además de Mg^{2+} . Utilizan a la S-adenosil metionina solo para la estimulación (Valadez y Kahl, 2005).

2.8. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) fue desarrollada como un método para la amplificación de las secuencias específicas de ADN. Utiliza el mismo principio de la ADN polimerasa en la síntesis de una cadena complementaria del ADN en la dirección $5'$ - $3'$, pero emplea dos primers (secuencia de nucleótidos de 20 - 25 pb) cada uno complementario a las cadenas de la región del ADN de extremos, que se ubicarán una vez se ha denaturado el ADN por calor, y dirigen la síntesis del DNA hacia otro primer (Gutiérrez, 2006). Un ciclo de PCR consta de tres etapas (Figura N° 3):

- La primera etapa, es la etapa de denaturación, y es aquella en la que por medio del aumento de la temperatura a aproximadamente $95\text{ }^{\circ}\text{C}$, se separan las 2 hebras de la molécula de ADN (hebras moldes) para su posterior amplificación.
- La segunda etapa, denominada de acoplamiento o "annealing" consiste en una reducción de la temperatura a $35 - 60\text{ }^{\circ}\text{C}$. Con esta reducción se permite que los primers se hibridasen con las secuencias complementarias del ADN.
- En la tercera y última etapa, el partidor sirve como molde y actúa como complejo de iniciación para la ADN polimerasa. En esta etapa ocurre la elongación de la nueva hebra de ADN, debido al aumento de la temperatura a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$, temperatura óptima para el funcionamiento de la ADN polimerasa de *Thermus aquaticus* (Taq). Esta enzima permite la unión de los nucleótidos complementarios (nueva hebra de ADN) a la hebra molde (Stolovitzki y Cecchi, 1996).

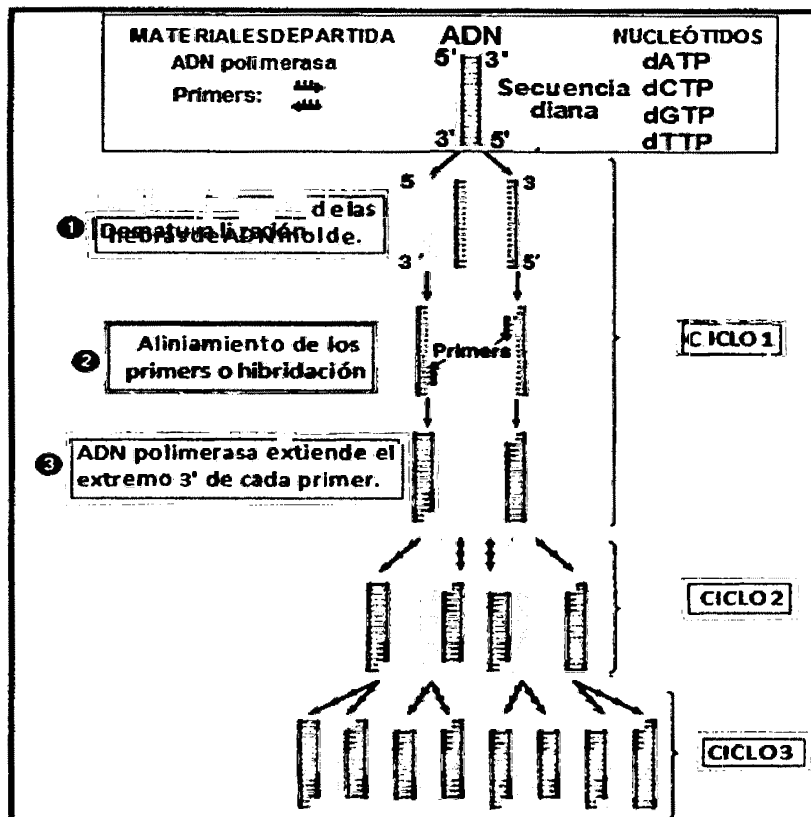


Figura N° 3. Esquema de la reacción en cadena de polimerasa (PCR)
<http://www.pseudomonasyringae.org/Outreach/Module3Home.htm>

Tiene varios requerimientos, entre los cuales es indispensable un molde de ADN, moléculas iniciadoras llamadas "primers", una enzima ADN polimerasa resistente a fluctuaciones de temperatura, una mezcla de desoxiribonucleótidos trifosfatos (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), un amortiguador apropiado y un equipo llamado termociclador que tiene la capacidad de cambiar la temperaturas dependiendo del ciclaje programado (Valadez y Kahl, 2005).

2.9. MARCADORES MOLECULARES

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 (Levitus y Col., 2010).

Se consideran bajo esta denominación los constituidos por los fragmentos de ADN; que pueden ser de tamaños muy diferentes, desde pequeñas secuencias hasta trozos que pueden contener algún gen, si bien no importa si dichos fragmentos contengan o no fragmentos codificantes. Pueden detectarse en cualquier estado del desarrollo, incluyendo el mismo embrión. Se distribuye a lo largo de todo el genoma (Cubero, 2003).

Los diferentes tipos de marcadores se distinguen por su capacidad de detectar polimorfismos en loci únicos o múltiples y son de tipo dominante o codominantes (Simpson, 1997). Las características que hacen del uso de los marcadores moleculares más conveniente que el de los marcadores morfológicos son las siguientes:

a) Neutralidad fenotípica

A diferencia de los marcadores morfológicos, los marcadores moleculares no presentan influencia fenotípica, esto significa que la interacción entre el medio ambiente y las regiones de ADN, empleadas como marcadores es nula, ya que éstas no son codificantes. Se puede hacer el estudio del fenotipo sin interferencia alguna del locus marcador (Trujillo, 2004).

b) Polimorfismo

Esta característica es muy importante, ya que depende directamente de la variación alélica del marcador, que está condicionada a las características reproductivas del organismo, a las migraciones (flujo génico), así como los eventos moleculares que presenta la herencia del marcador, recombinación

genética, mutaciones puntuales, insertos/delecciones (indel), entre otros; además los métodos para detectar el polimorfismo en los marcadores moleculares son mucho más sensibles y objetivos que los empleados para marcadores morfológicos (Trujillo, 2004).

c) Abundancia

Esta referido a la ocurrencia de variaciones alélicas, en los marcadores moleculares, a lo largo de todo el genoma de una especie. Teóricamente es posible cubrir todo el genoma y detectar todos los poligenes de una especie (Trujillo, 2004).

d) Codominancia / dominancia

En cualquier generación segregante se puede detectar los diferentes alelos de un marcador molecular. La mayoría de estos marcadores son de naturaleza codominante (Trujillo, 2004). Los AFLP son marcadores bialélicos dominantes (Vos y Col., 1995).

e) Ausencia de epistasis y pleiotropía

La epistasis es el tipo de interacción génica en el cual la acción de unos o más genes se ve influenciada por la expresión de genes situados en loci diferente. La pleiotropía es la expresión múltiple de un gen, influyendo sobre procesos bioquímicos distintos a los que tienen como objetivo principal (Trujillo, 2004).

Los marcadores moleculares están exentos de estos efectos de interacción génica, razón por la cual es posible emplear un gran número de marcadores sobre una población para mapear poligenes (Trujillo, 2004).

Un marcador molecular monomórfico es invariable en todos los organismos estudiados, pero cuando presenta diferencias en el peso molecular, actividad

enzimática, estructura, o sitios de restricción, se dice que es polimórfico (Miesfeld, 1999). Es por estas y por muchas otras razones que se llevó a cabo el desarrollo de los marcadores moleculares, los que a pesar de tener diferentes bases moleculares tienen la misma concepción de determinar la organización de la estructura genética en poblaciones naturales y cultivadas, además de demostrar la similitud entre y dentro de las poblaciones evitando el efecto ambiental (Becerra y Paredes, 2000).

2.10. DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA MEDIANTE AFLP

El análisis de polimorfismo de la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs) (Figura Nº 4), representa la tecnología más reciente para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

Desde su desarrollo (Vos y Col., 1995), los marcadores AFLP constituyen una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar. Desde su desarrollo y divulgación esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de plantas (Levitus y Col., 2010).

En cuanto a la cantidad de ADN inicial para el protocolo AFLP, no parece existir una medida establecida. Vos y Col., (1995), recomendaba utilizar 500 ng de ADN genómico para la restricción. Se propone incrementar la cantidad inicial de ADN a 600-700 ng especialmente si se trabaja con ADN parcialmente degradado. Sin embargo, otros autores describen la obtención exitosa de perfiles AFLP a partir

de cantidades de ADN genómico no superiores a 50 ng en todo caso la disponibilidad de ADN inicial se ve limitada por la naturaleza de la muestra (Gonzales, 2008).

AFLP es una técnica robusta en donde los resultados no son afectados por pequeños cambios en los parámetros de amplificación y donde la baja sensibilidad a las variaciones en la concentración del ADN molde, permite obtener patrones muy similares de bandeo. Sin embargo esta técnica necesita de ADN de alta calidad para su desarrollo, para lo cual el método de extracción de CTAB es uno de los más recomendados (Stewart y Vía, 1993).

El polimorfismo de los marcadores AFLP entre individuos puede resultar de varios tipos de cambios.

- **Mutaciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción, en donde una secuencia específica para el reconocimiento de una endonucleasa de restricción está presente o ausente.**
- **Polimorfismo en la longitud de la secuencia, donde el número de las secuencias repetidas arregladas en serie (tándem) tienen sitios variables (Valadez y Kahl, 2005).**
- **Mutaciones en la secuencia reconocida por los iniciadores.**
- **Inserciones o deleciones dentro de los fragmentos de restricción, lo cual se pone de manifiesto por la presencia de bandas de diferentes tamaños (Alagón y Rosas, 2008).**

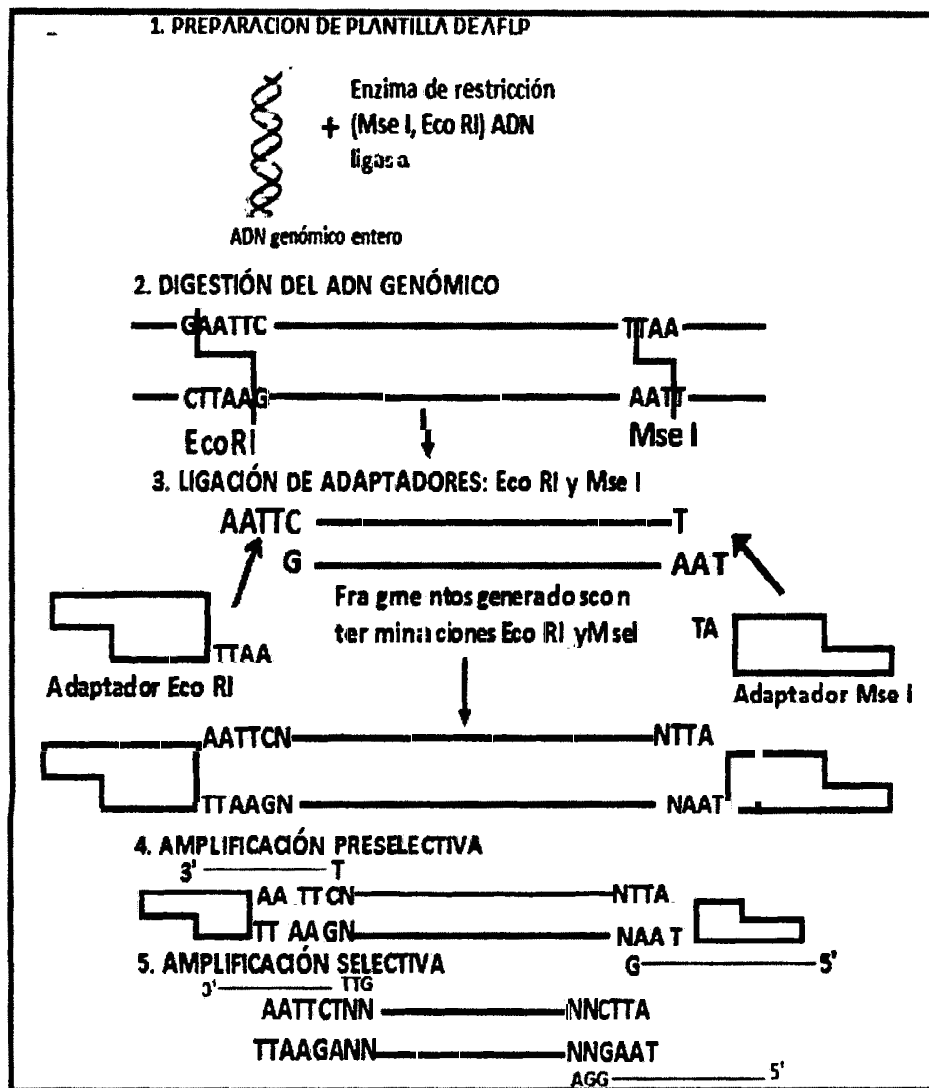


Figura N° 4. Representación de etapas del marcador AFLP.

Fuente: Propia

Etapas de AFLP consta esencialmente de cuatro etapas:

a) Digestión del ADN genómico

El ADN es digerido con dos enzimas (endonucleasa) de restricción diferente. Un corte raro, cuyo sitio de restricción tiene seis nucleótidos, por ejemplo EcoRI (G/AATTC) y otra de corte frecuente, con un sitio de restricción de cuatro nucleótidos, MseI (T/TAA) (Vos y Col., 1995). El corte frecuente sirve para generar fragmentos pequeños, los cuales amplifican bien y tiene el rango óptimo

de tamaño para la separación en un gel de secuenciación, mientras que el corte raro limita el número de fragmentos que son amplificados. Empleando los dos enzimas se generan tres tipos de fragmentos de extremos cohesivos (Eco/Eco, Eco/Mse y Mse/Mse) que al emplear una sola enzima, los fragmentos Eco/Mse son amplificados sobre los fragmentos Eco/Eco o Mse/Mse, usando enzimas ligasas se une a los extremos libres de los fragmentos digeridos adaptadores sintéticos que tienen una secuencia complementaria a los iniciadores que se usan en el siguiente paso (Alagón y Rosas, 2008).

El número de fragmentos amplificados depende del tamaño del genoma, la frecuencia de corte de las enzimas, y el número y naturaleza de las bases selectivas adheridas a los cebadores "primers" de la PCR (Jaramillo, 2003).

b) Ligación del ADN

Esta segunda etapa consiste en la incorporación de adaptadores de ADN de doble cadena, se adhieren en forma específica a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción. Por ejemplo, los adaptadores EcoRI específico se unen a los extremos "adhesivos" producidos por la EcoRI mientras que los adaptadores MseI se unen específicamente a los extremos resultantes del corte con la enzima MseI (Ferreira y Grattapaglia, 1998), generando así el molde para la amplificación del ADN (Picca y Col., 2004).

c) Selección de combinación de iniciadores

La elección del número y secuencia de iniciadores "primers" que son usados en la amplificación selectiva es un paso importante de proceso de AFLP, ya que determinará en nivel de polimorfismo accesible en este estudio. Un buen primers debe discriminar individuos procedentes de diferentes poblaciones, pero también

ser lo suficientemente polimórfico en la población, precisamente para identificar los clones (Von, 2003).

d) Amplificación de los fragmentos digerido-ligado

En este paso se realizan dos tipos de amplificación:

❖ Amplificación preselectiva (“pre-amplificación”)

En esta tercera etapa, se usan iniciadores (primers) donde el extremo 3' contiene un nucleótido al azar (Vos y Col, 1995), que es una base selectiva (Eco +A y Mse +C) complementaria a la secuencia del fragmento. Con base selectiva se consigue la reducción del número de fragmentos a analizar.

El iniciador es una secuencia complementaria a la secuencia del adaptador. Los productos de los pasos de digestión/ ligación y pre-amplificación pueden ser corridos y visualizados en geles de agarosa al 1,2 % la visualización de la muestra pre-amplificada debe mostrar un barrido (smear) lo que indica que las reacciones previas están correctamente realizadas y es seguro seguir con la amplificación siguiente.

❖ Amplificación selectiva

El objetivo de este paso es restringir el nivel de polimorfismo con el uso de bases selectivas al azar que permite la amplificación de solo un grupo de fragmentos de restricción (aquellos en que coincide la secuencia del adaptador + sitio de restricción + bases selectivas) (Picca y Col., 2004). Aquí se pueden usar diferentes combinaciones de iniciadores (primers) con tres bases selectivas, en este paso los iniciadores pueden ser marcados con ^{33}P o ^{32}P (método radiactivo), con productos fluorescentes (método de tinción con nitrato de plata).

El diseño de dos amplificaciones consecutivas hace más reproducible el patrón de bandas se obtiene un número de fragmentos amplificados que va de 10 a 100 con un promedio de 50 (Alagón y Rosas, 2008).

e) DETECCIÓN DE FRAGMENTOS AFLP

El análisis de los fragmentos amplificados mediante su desnaturalización por electroforesis en geles de poliacrilamida de tipo desnaturalizante (de alta resolución) y visualización por autorradio grafía o por tinción con nitrato plata (Karp y Col., 1997). El proceso de tinción consiste en unos pocos pasos, básicamente: fijación, tinción y revelado. El gel de AFLP se fija en ácido acético 10 % para remover los restos del buffer de electroforesis y la urea, y para evitar la difusión de los pequeños productos de amplificación. A continuación, se tiñe el gel con una solución que contiene nitrato de plata, posteriormente, se revela con una solución alcalina de hidróxido de sodio que contiene formaldehído y tiosulfato de sodio. Bajo estas condiciones los iones de la plata se reducen a iones metálicos por acción del formaldehído. El revelado de las bandas del ADN se deja evolucionar hasta obtener la coloración y contraste deseados. La velocidad de la reacción es dependiente de la temperatura y se detiene por el agregado de ácido acético. Luego de la tinción, los fragmentos de ADN se visualizan directamente en el gel mediante un transiluminador de luz blanca. La recopilación de los datos de geles teñidos con nitrato de plata se hace mediante apreciación visual (Alagón y Rosas, 2008). Normalmente en el caso del ADN genómico de las plantas bajo estas condiciones de amplificación, se observan 50 a 100 bandas por muestra (Simpon, 1997).

2. 11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

2. 11.1. TAXONOMÍA NUMÉRICA

La taxonomía numérica ha sido definida como la evaluación numérica de la afinidad o la similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas en taxones mediante operaciones matemáticas, basándose en el estado de sus caracteres (Sneath y Sokal, 1973; Crisci y López, 1983), la taxonomía numérica se usa para eliminar subjetividades en el proceso de asignar individuos o clases previamente definidos. Al usar procedimientos estadísticos, la clasificación de los individuos en los grupos se hace con objetividad (Sevilla y Holle, 2004).

2. 11. 2. UNIDAD TAXONÓMICA OPERATIVA (OTU)

Las siglas OTU son las siglas de Operacional Taxonómic Unit, en español unidad taxonómica operativa. Dicho de manera práctica son las unidades en estudio, el rango taxonómico de estas dependerá del objetivo del estudio si se quieren caracterizar todas las accesiones de una misma especie existente en un banco de germoplasma, con el fin si existen duplicados, homónimos o sinónimos, cada una de las accesiones sería una OTU si por el contrario lo que se quiere analizar es la variedad intrapoblacional, la OTU sería el individuo (Gonzales y Pita, 2001).

2. 11. 3. CARACTERES

El carácter puede definirse como cualquier propiedad que varía en las OTUs en estudio. Los posibles valores que ese carácter pueda presentar se los considera sus estados (Sneath y Sokal, 1973; Alagón y Rosas, 2008).

La clasificación se hace en base a un gran número de caracteres morfológicos, fisiológicos, adaptativos, anatómicos, citológicos, etc. Cuando se incluyen marcadores moleculares que identifican porciones del ADN de los individuos, se

toma en cuenta las relaciones genealógicas en el entendido que la similitud en el ADN es la mejor evidencia de semejanza filogenético. La clasificación biológica es más real, o sea los grupos separan a individuos realmente distintos, cuando los caracteres diferenciales están gobernados por muchos genes; en términos moleculares eso significa que el ADN de los individuos separados en grupos distintos debe ser más diferente que el ADN de los individuos separados en grupos distintos debe ser más diferente que el ADN de individuos localizados en el mismo grupo, no basta que los individuos sean fenotípicamente distintos porque si el carácter está gobernado por un solo gen, la diferencia en el ADN de individuos diferentes es mínima (Sevilla y Holle, 2004).

2. 11.3.1. ELECCIÓN DE CARACTERES

La caracterización debe llevarse a cabo utilizando el mayor número de caracteres posibles. Se eligen los caracteres que describan a las OTUs y se registra el estado de los caracteres presentes en ellas. El número de caracteres posibles es casi limitado, por lo tanto desde el punto de vista estadístico no puede sostenerse que el conjunto de todos los caracteres posibles forman una población al azar (Sneath y Sokal, 1973; Alagón y Rosas, 2008).

2.11.3.2. CODIFICACIÓN DE LOS CARACTERES

Los caracteres taxonómicos forman parte del universo denominado "datos científicos" y responden a las exigencias de éste. El científico observa hechos y los registra en datos. Los datos son representaciones simbólicas de los eventos y los estados y se obtienen por la observación (Kneller, 1978).

Para tratar estadísticamente los resultados de un estudio caracterización molecular, los caracteres deben ser correctamente codificados desde el punto de vista numérico (Sneath y Sokal, 1973; Alagón y Rosas, 2008). Existen distintas

categorías de datos y se han propuesto numerosas clasificaciones para expresar esa variabilidad (Clifford y Stepheson, 1975).

Tabla N°02. Tipos de datos para la codificación de caracteres

TIPO DE DATOS		
Datos doble estado	Presencia - ausencia	
	Estados excluyentes	
Datos multiestado	Cualitativos	Sin ausencia lógica
		Con ausencia lógica
	Cuantitativos	Continuos
		Discontinuas

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

✓ **Datos doble estado:**

Son los llamados datos binarios o predicados dicotómicos, es decir aquellos que tienen solo estado. Pueden indicar presencia/ausencia y estados excluyentes.

Tabla N°03. Tipos de datos de doble estado

Carácter	Estado	Codificación
	Presencia	1
	Ausencia	0

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

2.11.4. MATRIZ BÁSICA DE DATOS

La matriz básica de datos (MBD) es una matriz rectangular, colocando en fila los caracteres y en las columnas las OTUs analizadas. Por tanto, la matriz recoge de cada carácter el valor de cada carácter en cada una de las OTUs. En el caso de que exista variabilidad intra OTU se tomará como valor representativo de cada carácter en cada OTU (Gonzales y Pita, 2001).

2.11.5. COEFICIENTE DE SIMILITUD

El parecido o similitud es cuantificable aplicando un coeficiente de similitud. Con el uso de los coeficientes en operaciones matemáticas pueden calcularse las similitudes (distancia) respecto a cada par posible de OTU de una matriz de datos (Crisci y López, 1983). Existen diferentes tipos de coeficientes basados en fundamentos matemáticos.

✓ Coeficientes de distancia

Se aplica sobre matrices básicas que presentan datos doble – estado o multiestado, o en las que poseen ambos tipos de datos (datos mixtos).

✓ Coeficiente de correlación

Calcula la similitud midiendo la separación angular formada por dos líneas que parten del origen de las coordenadas y pasan por las OTU j y k. los coeficientes de correlación son funciones de esos ángulos.

✓ Coeficientes de asociación

Miden la similitud entre cada par de individuos a partir de la información que proporcionan los caracteres medidos sobre los mismos. El coeficiente de asociación mide las coincidencias y diferencias en los caracteres entre los OTUs, cuando estos tienen solo dos estados para cada par de características. Los datos son presencia (codificado con 1) o ausencia (Codificado con 0) (Sevilla y Holle, 2004).

Si se compara un carácter de doble estado de dos OTUs j y k, se presentan cuatro posibilidades que se observan a continuación.

Tabla N°04. Matriz (2x2) que muestra las combinaciones posibles al compararse dos OTUs (j y k) para un carácter de tipo doble estado.

	OTU k		
OTU j	Presente(1)	1 0	A+b
	Ausente (0)	0,1 1,0	C+d
		a+c b+d	
			m=a+b+c+d

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

Donde

- 1,1 (a) Ambos OTUs tienen el carácter comparado
- 1,0 (b) El carácter está presente en el primer OTU y ausente en el segundo.
- 0,1 (c) El carácter están ausente en el primer OTU y presente en el segundo.
- 0,0 (d) Ambos OTUs presentan ausencia del carácter comparado.

El coeficiente varía de 0 a 1, siendo el valor 1 el que expresa la máxima semejanza entre dos OTUs.

2.11.5.1. ELECCIÓN DEL COEFICIENTE DE SIMILITUD

La elección del coeficiente de similitud dependerá del tipo de datos que constituyan la Matriz Básica de Datos (MBD). Generalmente los coeficientes de distancia y los coeficientes de correlación se usan para los datos multiestado y los coeficientes de asociación y de distancia se utilizan para los datos doble estado.

Los coeficientes de similitud más utilizados para datos binarios tenemos: el coeficiente de similitud de Dice y Sorensen; el Coeficiente de similitud de

Jaccard (J) y el coeficiente de similitud de Socal y Michner o coeficiente de concordancia Simple Maching (SM).

✓ **COEFICIENTE DE SIMILITUD DE DICE Y SORENSE**

$$S_D = \frac{2a}{2a + b + c} = \frac{A}{(a + b) + (a + c)}$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008

Da mayor importancia a las dobles presencias.

Es la proporción de caracteres co-presentes respecto al promedio de los caracteres presentes en cada OTU.

✓ **COEFICIENTE DE SIMILITUD DE JACCARD (SNEATH)**

$$S_J = \frac{A}{a + b + c}$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

No considera las dobles ausencias.

Es la proporción de caracteres presentes que comparten respecto al total de caracteres presentes en las 2 OTUs.

Puede usarse con datos de marcadores dominantes (RAPD y AFLP), por tanto las ausencias podrían corresponder a recesivos homocigóticos.

✓ **COEFICIENTE DE SIMILITUD DE SIMPLE MACHING**

$$S_{SM} = \frac{a + b}{a + b + c + d}$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008

Simplemente es la representación de caracteres que comparten las dos muestras. Para considerar algunos criterios en la selección de los coeficientes de similitud se tiene que tener en cuenta la concepción del mismo. Dos muestras se consideran más asociadas cuando comparten "únicos" como "ceros" ya que la codificación que se asigna es indistinta (Winzery Col., 2004).

2.11.5.2. MATRIZ DE SIMILITUD

Con los valores de similitud obtenidos de cualquiera de los coeficientes de similitud para los pares posibles de OTUs ordenados en forma tabular constituyen la matriz de similitud (Crisci y López, 1983); la cual es de tipo diagonal y recoge el valor de similitud entre OTUs. En ocasiones en vez de matrices de similitud se calculan las matrices de distancia entre todos los pares posibles de OTU (Gonzales y Pita, 2001).

2.11.6. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS

El análisis de agrupamiento comprende técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTUs que se asocian por el grado de similitud. Las más utilizadas son las del siguiente tipo: Exclusivas, jerárquicas, aglomerativas y secuenciales SAHN (Secuencial, Agglomerative, Hierchical y Nested). El significado de cada uno de los términos es el siguiente:

- ✓ **Técnicas exclusivas:** originan grupos donde los OTUs son exclusivistas del grupo del cual forman parte y no pueden pertenecer a otro que se halle en un mismo rango o nivel.
- ✓ **Técnicas jerárquicas:** originan conjuntos que presenta rangos, en los cuales las OTUs o grupos de OTUs subsidiarios forman parte de un grupo mayor o exclusivo.

- ✓ **Técnicas aglomerativas:** son las que partiendo en “n” OTUs separadas las agrupa en sucesivos conjuntos para llegar finalmente en un solo conjunto que contiene a las “n” unidades.
- ✓ **Técnicas secuenciales:** se forma un grupo se cada vez, hasta que se agota el conjunto total.

El proceso a seguir en un análisis de agrupamiento es el siguiente:

- a. Examen de la matriz de similitud para localizar el valor de similitud más alto, lo conduce a la formación del primer núcleo (conjunto formado por dos OTUs).
- b. Se busca el próximo valor de mayor similitud, lo que puede suponer la formación de nuevos núcleos, incorporación de nuevo OTU a un núcleo, con lo que se originaría un rango (conjunto por más de dos OTU), fusión de núcleos existente.
- c. Se repite la segunda etapa hasta agotar las OTUs. El resultado final es la obtención de un dendograma.

Existen métodos para el cálculo de la similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo al que se incorpora. El más utilizado es el UPGMA “Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages” o media aritmética ponderada no ponderada (Gonzales y Pita, 2001).

Según este método las OTUs se incorporan a grupos o núcleos ya formados, teniendo en cuenta que el valor de similitud será el promedio de los valores de similitud entre los pares posibles de OTUs provenientes una de cada grupo o núcleo (Gonzales y Pita, 2001).

2.11.7. DENDOGRAMA

Un dendograma es una representación gráfica en forma de árbol que resume el proceso de agrupación en un análisis de clusters, que representan los conglomerados por líneas horizontales proyectados de izquierda a derecha, que se conectan y unen secuencialmente mediante líneas verticales trazadas al correspondiente nivel de disimilaridad conforme se cierran los clusters, preservando la razón de los coeficientes en cada paso; cuanto antes se cierran es que más parecidos entre sí son los elementos, y cuanto más tardan en cerrarse es que son menos afines (Mongay, 2005). Los objetos similares se conectan mediante enlaces cuya posición en el diagrama está determinada por el nivel de similitud/disimilitud entre los objetos (Villardón, 2000). El dendograma (fenograma) es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos o más OTUs. Básicamente un dendograma incluye a dos tipos de graficas: fenogramas y cladogramas, el primero representa relaciones fonéticas, en cambio, en el segundo las ramificaciones están basadas en las conexiones filogenéticas entre las OTUs (Crisci y López, 1983).

2.11.7.1. COEFICIENTE DE CORRELACIÓN COFENÉTICA (r)

Si se examina con atención las técnicas de construcción de un dendograma, se comprobaba que es imposible que el dendograma sea un reflejo exacto de la matriz de similitud. Algunas de las relaciones de similitud serán necesariamente distorsionadas al realizar una representación bidimensional.

Se han propuesto varias técnicas para medir el grado en el dendograma representa los valores de la matriz de similitud. La técnica más conocida es la del coeficiente de correlación cofenética (r) establecida por Rohlf y Sneath

(1962). El cual consiste en construir una nueva matriz de similitud denominada "matriz cofenética" (Crisci y López, 1983).

El coeficiente de correlación cofenética es una medida de la distorsión interna de la técnica, pero no una evaluación de la clasificación que se construirá a partir de la clasificación que se construirá a partir del dendograma (Rohlf, 1970).

Los valores de la correlación cofenética pueden interpretarse de la siguiente manera:

$0,9 \leq r$: muy buena correspondencia

$0,8 \leq r < 0,9$: buena correspondencia

$0,7 \leq r < 0,8$: correspondencia

$R > 0,7$: correspondencia.

2.11.8. DETERMINACIÓN DEL ÍNDICE DE CONTENIDO DE POLIMÓRFICO (PIC)

El PIC (Polimorfismo Índice Content) se utiliza para estimar la capacidad de cada marcador para revelar los loci polimórficos en el germoplasma. A mayor valor de PIC, mayor información dará el marcador AFLP.

Si los valores de PIC de cada Marcador son sumados entonces se podrán tener un índice de iniciador de AFLP (Senior y Col., 1998). Los iniciadores que presenten altos valores de este índice, tendrán mayor capacidad para mostrar la variabilidad genética en la caracterización del germoplasma.

El PIC es similar al valor de la heterocigosidad y oscila entre 0 y 1. Este índice evalúa la informatividad de un marcador en la población de acuerdo a la frecuencia de los alelos. Para su cálculo se multiplica la probabilidad de cada posible cruzamiento (estimado a partir de las frecuencias alélicas) por la

probabilidad que sean informativos, es decir, que se pueda identificar al progenitor del que procede el alelo (Botstein y Col., 1980).

$$\begin{aligned} \text{PIC} &= 1 - \sum_{i=1}^n f_i^2 \\ &= 1 - p^2 - q^2 \\ &= 1 - f^2(1) - f^2(2) \end{aligned}$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008

Donde

f_i : es la frecuencia del i-ésimo alelo.

p : frecuencia de bandas presentes.

q : frecuencia de las bandas ausentes

2.11.9. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD

Para el análisis de los datos se ingresan estos en una matriz binomial, la que fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par de genotipos usando los coeficientes de Dice y Simple Matching, incluidos en el paquete estadístico NTSYS-pc 2.1 (Applied Biostatics Inc., Setauket, Nueva York, EE.UU). Los análisis con los coeficientes de similitud genética se realizaron usando el modo SIMQUAL, obteniéndose una matriz de similitud genética para cada coeficiente.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular, de la Facultad de Ciencias Biológicas, de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga (UNSCH), y en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA) – Lima.

3.1. MATERIAL BIOLÓGICO

El material vegetal utilizado proviene de las comunidades de: Huarcca, Auquiraccai, Anco, Oscocococha, Huayllahura. Ubicados en el distrito de Anco, Provincia de La Mar (entre los 3914 – 4000 m.s.n.m.). Luego los tubérculos de las papas nativas recolectadas, fueron cultivados en el vivero de la ciudad universitaria de la UNSCH, para la extracción del ADN.

En total se analizaron 38 morfotipos de la colección de papas nativas que fueron seleccionadas y proveídos por los mismos productores agrarios. Los datos pasaporte de los morfotipos utilizadas se muestran en el Anexo 1.

3.2. DISEÑO METODOLÓGICO PARA RECOLECCIÓN DE DATOS

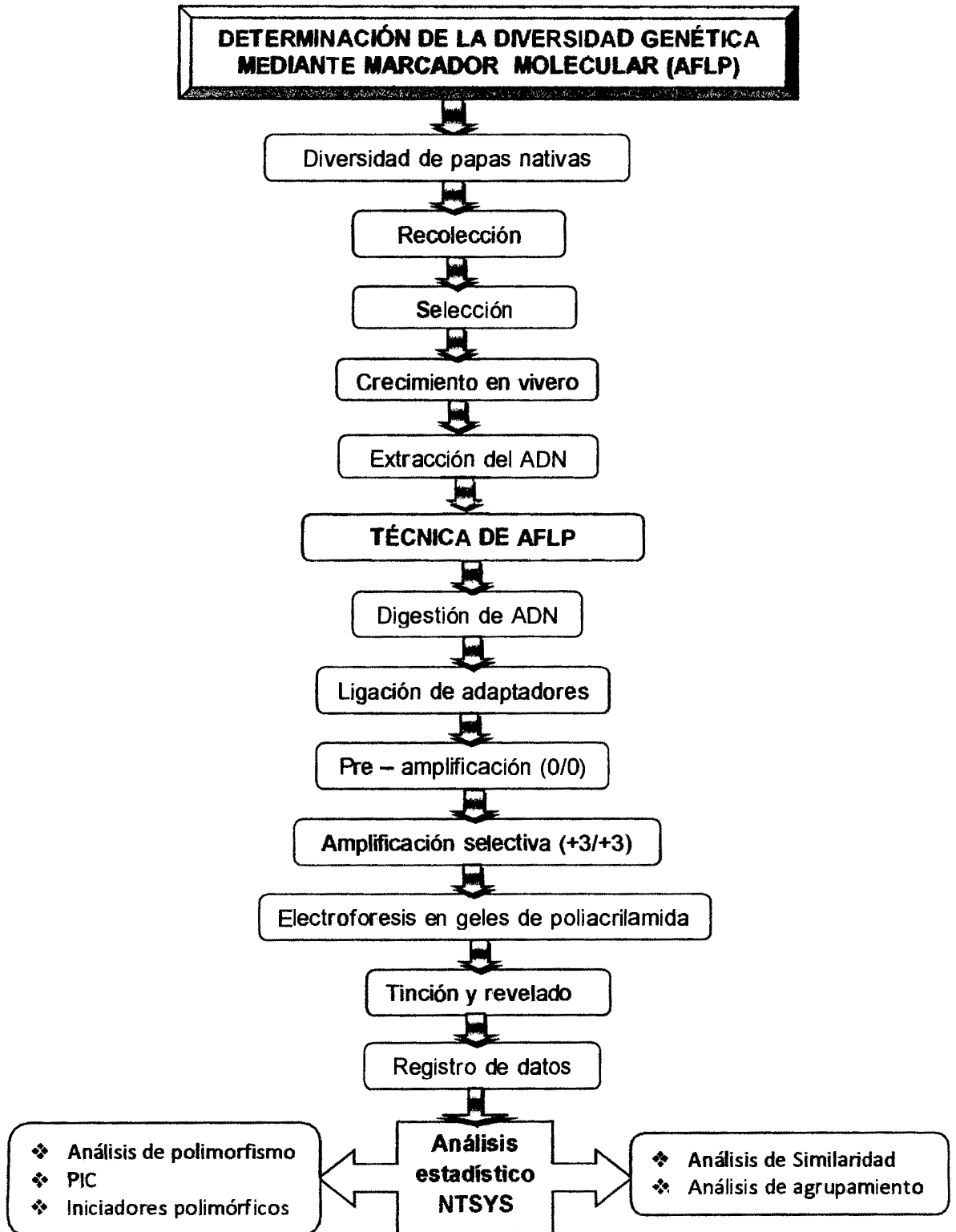


FIGURA N°5. Flujoograma del análisis de la diversidad genética.

3.2.1. RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS

Las muestras fueron obtenidas de total de 38 morfotipos de papas nativas de las comunidades campesinas de Huarcca, Auquiraccai, Anco, Oscococcocha, Huayllahura, perteneciente al distrito de Anco, provincia La Mar - Ayacucho.

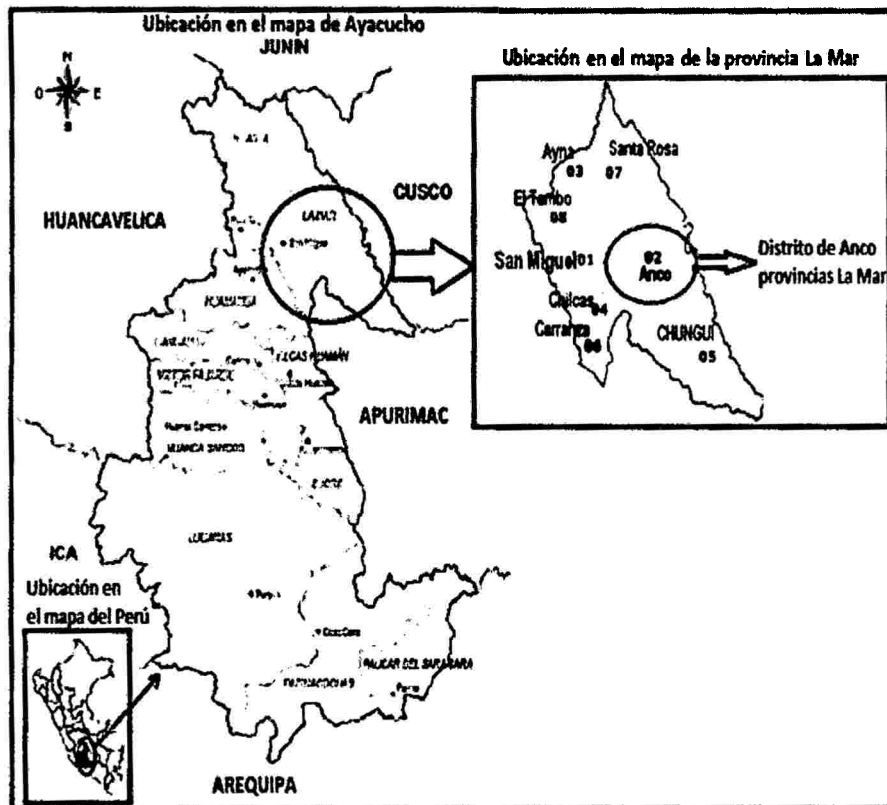


Figura N° 6. Ubicación geográfica del distrito Anco. (Modificado de <http://www.peru/ayacucho/dub-viaje-la-mar- htm>)

3.2.2. CULTIVO EN EL VIVERO

Los tubérculos de papas nativas fueron recolectados y luego transportados al Laboratorio de Biología Celular y Molecular. Trascorrido tres meses fueron sembradas en el vivero de la ciudad universitaria de la UNSCH.

A partir del material vegetal de las hojas de dos a tres semanas de crecimiento, se procedió a la toma de muestra, colocándolas en cartuchos de papel limpios

codificados respectivamente (rotulados), para su traslado al Laboratorio de Biología Celular, donde se procedió a limpiar y lavar suavemente la superficie del tejido libre de infección con agua destilada y seguido con alcohol al 70 %. Luego en condiciones de asepsia, se colocaron cada muestra en placas Petri estériles, debidamente rotuladas y de inmediato llevadas al congelador (lío-filizado) de -20 °C hasta el día siguiente de extracción del ADN genómico.

3.2.3. EXTRACCIÓN DE ADN

El ADN fue extraído a partir de tejido liofilizado por el método CTAB modificado (CIP, 1997) en el Laboratorio de Biología Celular y Molecular UNSCH. La descripción de los procedimientos en detalle en el Anexo 3.

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN

La calidad y la concentración (Figura N° 7) de ADN fue verificada por el método de electroforesis en geles de agarosa al 1 % (p/v), para la carga se preparó previamente una dilución de 1:10 de 1 uL de ADN con 9 uL de tampón de carga 1X (Blue Juice), con cuidado con la punta de la micropipeta y luego esta mezcla se corrió en geles de agarosa al 1 % como se detalla en el Anexo 4.

La estimación de la concentración de las muestras se realizó haciendo la comparación de la intensidad de banda de ADN con la primera banda del estándar de ADN Lambda (λ) digerida con la enzima restricción PstI. El cuál corresponde a una concentración de 280 ng/uL, cuya banda de más alto peso molecular es de 14800 pb. Luego se realizó la dilución a 50 ng/10 uL como muestra la (Figura N° 8), finalmente, la calidad de ADN es un factor crítico en la obtención de marcadores AFLP confiables, debiendo ser éste una buena calidad, sin contaminantes, ni inhibidores y no degradados.

3.2.5. TÉCNICA DE AFLPs

Antes de empezar la técnica de AFLP, se realizó una prueba piloto con muestras de ADN de seis morfotipos, lo cual permitió evaluar las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica.

Para la detección de los marcadores AFLP se realizó según los protocolos de Molecular markers protocols Curso - Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad (CIP, 2002). Esta metodología consta de cuatro etapas importantes según el procedimiento desarrollado por (Vos y Col., 1995): digestión, ligación, pre-amplificación selectiva y amplificación selectiva. En la presente investigación se realizaron algunas modificaciones tanto al método de extracción de ADN genómico como a la técnica AFLP que es como se detalla en los protocolos de los Anexos 5, 6 y 7.

3.2.5.1. DIGESTIÓN DEL ADN GENÓMICO

Para la digestión se preparó una solución conteniendo ADN genómico, con agua milli-Q, buffer de reacción "Tango 10 X", enzimas MseI y EcoRI en las cantidades como se muestra en el Anexo 5.

Posteriormente la reacción se incubó a 37 °C toda la noche (over night) para inactivar las endonucleasa de restricción, las muestras se incubaron a 75 °C por 15 minutos obteniéndose ADN digerido, con el fin de detener la reacción, las muestras fueron colocadas en el hielo. Luego se chequeo en el gel de agarosa al 1 %, tomando de la digestión 9 uL de la muestra y añadimos 1 uL de azul de carga 10 X para el Mix corrida, donde se observó un arrastre electroforético de color tenue a lo largo de la corrida a 100 V.

3.2.5.2. LIGACIÓN DE ADAPTADORES

A los fragmentos producidos de la digestión del ADN se agregaron el master Mix (MMx) para llevar a cabo la ligación de los adaptadores complementarios (Tabla N° 05) a los cortes de cada una de las enzimas de restricción. Para lo cual se preparó una solución conteniendo ADN digerido, T₄ ADN ligasa, buffer 5X T₄, adaptador MseI, adaptador EcoRI y agua milli-Q, posteriormente la solución se incubó a temperatura ambiente 20 °C toda la noche, EL ADN digerido y ligado está listo para el siguiente paso de pre- amplificación. De otra forma, mantenerlo en la congelación a -20 °C, hasta su uso, como se detalla en el Anexo 6.

Tabla N° 05. La secuencia de los adaptadores para EcoRI y MseI.

Nombre	Enzima	Secuencia (5' – 3')
EcoA1	EcoRI	5' – CTC GTA GACTGCGTA CC – 3'
EcoA2	EcoRI	5' – AAT TGGTACGCAGTC – 3'
MseA1	MseI	5' – GAC GATGAGTCC TGAG – 3'
MseA2	MseI	5' – TACTCA GGA CTC AT – 3'

3.2.5.3. PCR 1: REACCIÓN DE PRE-AMPLIFICACIÓN (00/00)

Se preparó al master mix (MMx) en tubos de tiras Eppendorf de 0,2 mL, con los componentes mencionados en el Anexo 7, manteniendo sobre hielo para la estabilidad de los mismos, se le adicionó 5 uL de ADN ligado directo. Los cuales fueron dispensados en los tubos de tiras de PCR de 96 pocillos (Quiagen) luego se homogenizó dando un spin down por 10 segundos. Inmediatamente la reacción de pre-amplificación de PCR se realizó en el termociclador, (Teche TC-5139), cual se programó bajo las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra a continuación.

Tabla N°06. Programa de pre-amplificación en T °C, tiempo y N° de ciclos.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
TAPA CALIENTE A 105 °C		
1	72 °C	2 min
2	94 °C	4 s
3	94 °C	30 s
4	56 °C	1 min
5	72 °C	1 min
6	Repetir desde el paso 3 al 5 (22 ciclos)	
7	72 °C	5 min
8	4 °C	Continua
9	FIN	

3.2.5.4. PCR 2: AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Para esta reacción se utilizaron las combinaciones de primers específicos conteniendo tres nucleótidos adicionales en sus extremos 3' para obtener una amplificación más selectiva de los fragmentos de ADN, como se detalla en el Anexo8.

Se preparó una solución de master mix (MMx) conteniendo agua milli-Q, Buffer 10X, dNTPs, Eco +3, Mse +3, MgCl₂ y Taqpol. Manteniendo cada componente sobre hielo para la estabilidad del mismo, el MMx previamente mezclado dando un spin down por 10 s luego se dispensó, en los tubos de tiras de PCR (Quiagen). Seguido se realizó PCR en el termociclador, (Teche TC-5139) el cuál se programó con las condiciones de temperatura y tiempo que se muestra a continuación.

Tabla N° 07. Programa de amplificación selectiva en T °C, tiempo y N° de ciclos.

Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
TAPA CALIENTE A 105 °C		
1	94°C	4 min
2	94°C	20 s
3	65°C	30 s
4	72 °C	2 min
5	94°C	20 s
6	65°C	30 s bajando 1 °C por ciclo
7	72 °C	2 min
8	Repetir desde el paso 5 al 7 ——— 10 ciclos	
9	94 °C	20 s
10	56°C	30 s
11	72°C	2 min
12	Repetir desde el paso 9 al 11 ——— 20 ciclos	
13	60°C	30min
14	4°C	Continua
15	FIN	

3.2.5.5. SELECCIÓN DE COMBINACIONES DE LOS INICIADORES

Para la selección de combinaciones se realizó un ensayo (screening), con seis combinaciones de primers en ocho individuos (genotipos) tomados al azar. De los cuáles, se eligieron las seis mejores combinaciones por presentar buena resolución de bandas, y buen nivel de polimorfismo y reproducibilidad. A

continuación se muestran las seis combinaciones de iniciadores con las que trabajó en el screening preliminar:

1. - EcoRI-ACT / MseI - CTG (E38 - M61)
2. - EcoRI-ACT / MseI - CAG (E38 - M49)
- 3.- EcoRI-ACG / MseI- CAT (E37- M50)
- 4.- EcoRI-ACA / MseI - CTG (E35 - M61)
- 5.- EcoRI-AGA / MseI - CAG (E39 - M49)
- 6.- EcoRI-ATG / MseI- CAG (E45 - M49)

3.2.5.6. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Los productos de la amplificación selectiva se corrieron en la cámara de electroforesis Vertical (Model S2), en geles desnaturalizantes de poliacrilamida al 6 % y 0,4 mm de espesor, según el Anexo 10.

3.2.5.7. TINCIÓN Y REVELADO DE LOS GELES DE POLIACRILMIDA

La visualización de los perfiles AFLP se realizó a través de la tinción y revelado de los geles de poliacrilamida en hidróxido de sodio. Así como se detalla en el Anexo 11.

3.2.5.8. ESCANEEO Y LECTURA (ESCOREO) DE BANDAS AMPLIFICADAS

El escoreo de las bandas con mejor resolución se realizó mediante la observación directa en un trans iluminador de luz blanca, en un rango de 100 a 240 pb rango en el cual las bandas se aprecian claramente distinguibles. Una vez hecha la lectura de las bandas, cada gel fue escaneado para almacenar su patrón de bandas.

paquete estadístico NTSYS-pc versión 2.1 (Applied Biostatics, Setauket, Nueva York, EE.UU).

3.2.6.4. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS

Con la matriz de similitud que fue obtenida del análisis de similaridad con cada uno de los coeficientes usados anteriormente se obtuvieron los dendogramas, que se realizaron según el algoritmo de UPGMA (Unweigthed Pair–Group Method usind Arithmetic Averages), dentro del módulo SAHN del programa.

IV. RESULTADOS

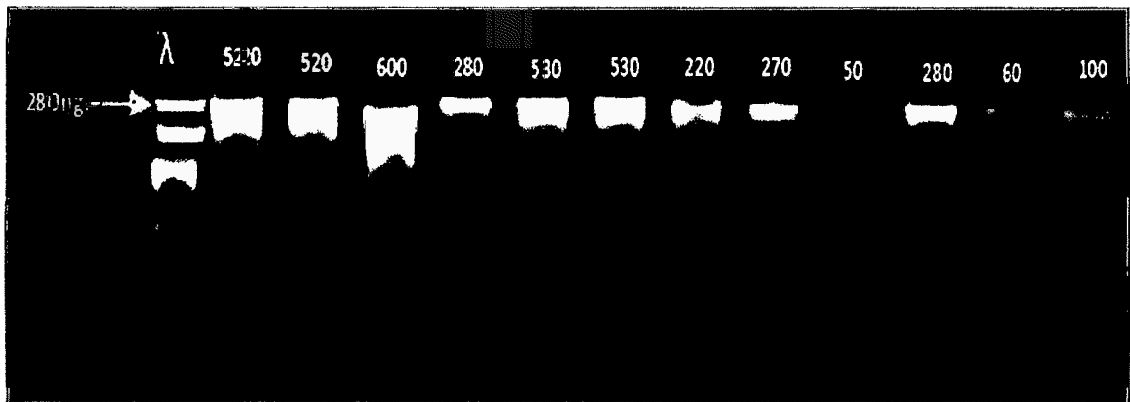


Figura N° 7. Análisis electroforético de la calidad y cantidad de ADN extraído y comparado con 280 ng de ADN de λ . Laboratorio de Biología Molecular INIA - Lima - Perú. 2011.

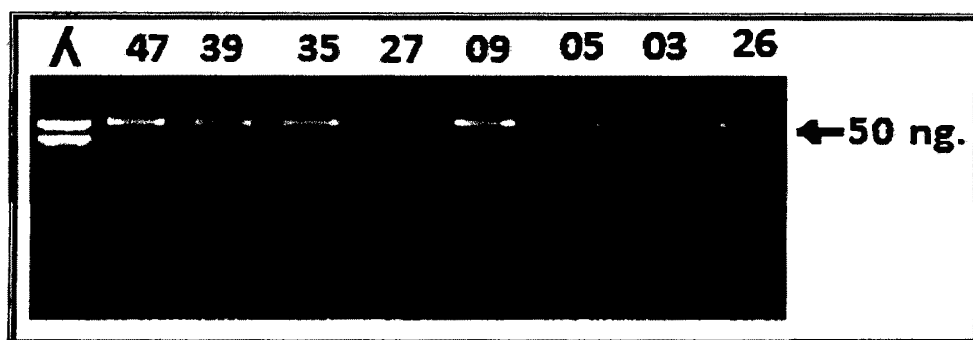


Figura N° 8. Diluciones de las muestras de ADN a una concentración de 50 ng
Mediante análisis electroforético en geles de agarosa al 1 % y comparado con
280 ng de ADN de λ . Laboratorio de Biología Molecular INIA– Lima - Perú. 2011.

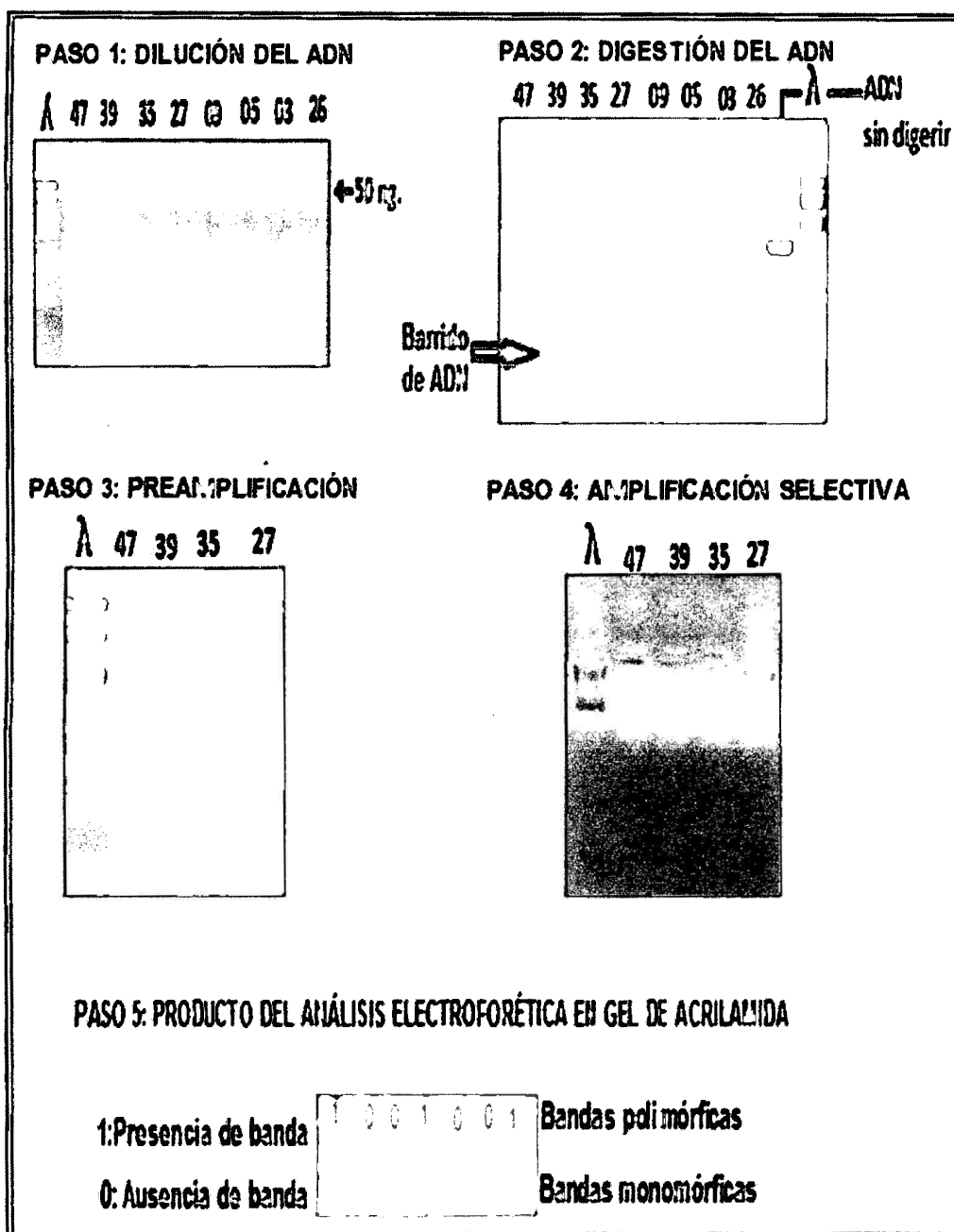


Figura N° 9. Etapas para la generación de marcadores AFLPs, registrados en el Laboratorio de Biología Molecular del INIA – Lima - Perú, 2011.

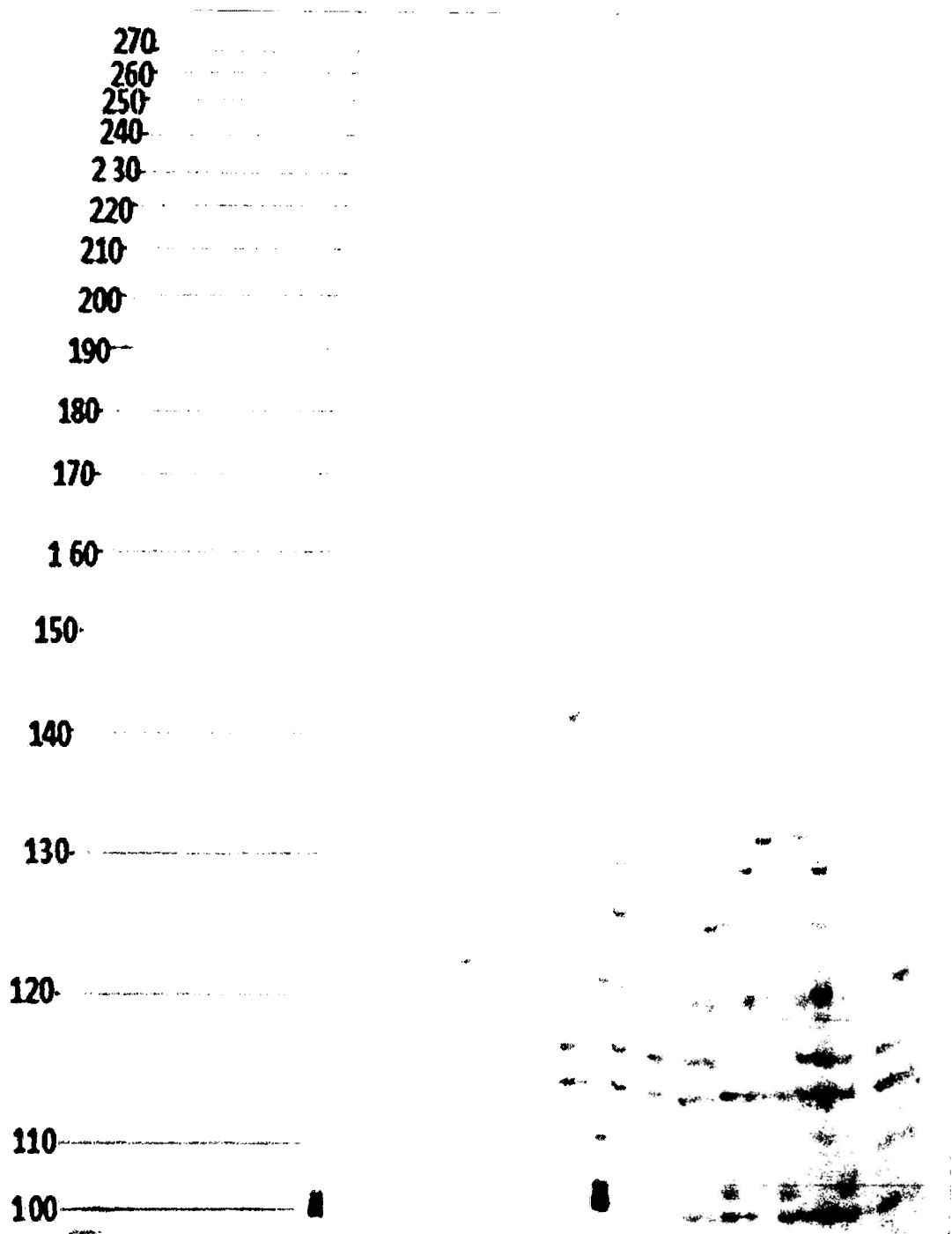


Figura N° 10. Patrones de bandas de ADN polimórfico de morfotipos de *Solanum* sp. "papas nativas" encontrados en electroforesis en gel de poliacrilamida al 6 %, empleando la combinación E35 – M49, obtenida en el Laboratorio de INIA – Lima. 2011.

Tabla N° 09. Número y porcentaje de bandas polimórficas y monomórficas detectadas en los patrones AFLP.

INICIADORES AFLP	bandas Mono.	% Bandas Mono.	Bandas Poli.	% Bandas Poli.	N°total de Bandas
E38-M61	6	18,8	26	81,3	32
E35-M49	9	26,5	27	79,4	34
E38-M49	6	20,7	23	79,3	29
TOTAL	21	66	76	240	95
Promedio	7	22	25	80	31,7

Leyenda

Bandas polimorfica: Poli.

Bandas monomorficas: Mono.

Tabla Nº 10. Valores de PIC para cada una de las combinaciones de iniciadores.

INICIADORES AFLP	ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO (PIC)
E38-M61	0,35
E35-M49	0,36
E38-M49	0,38

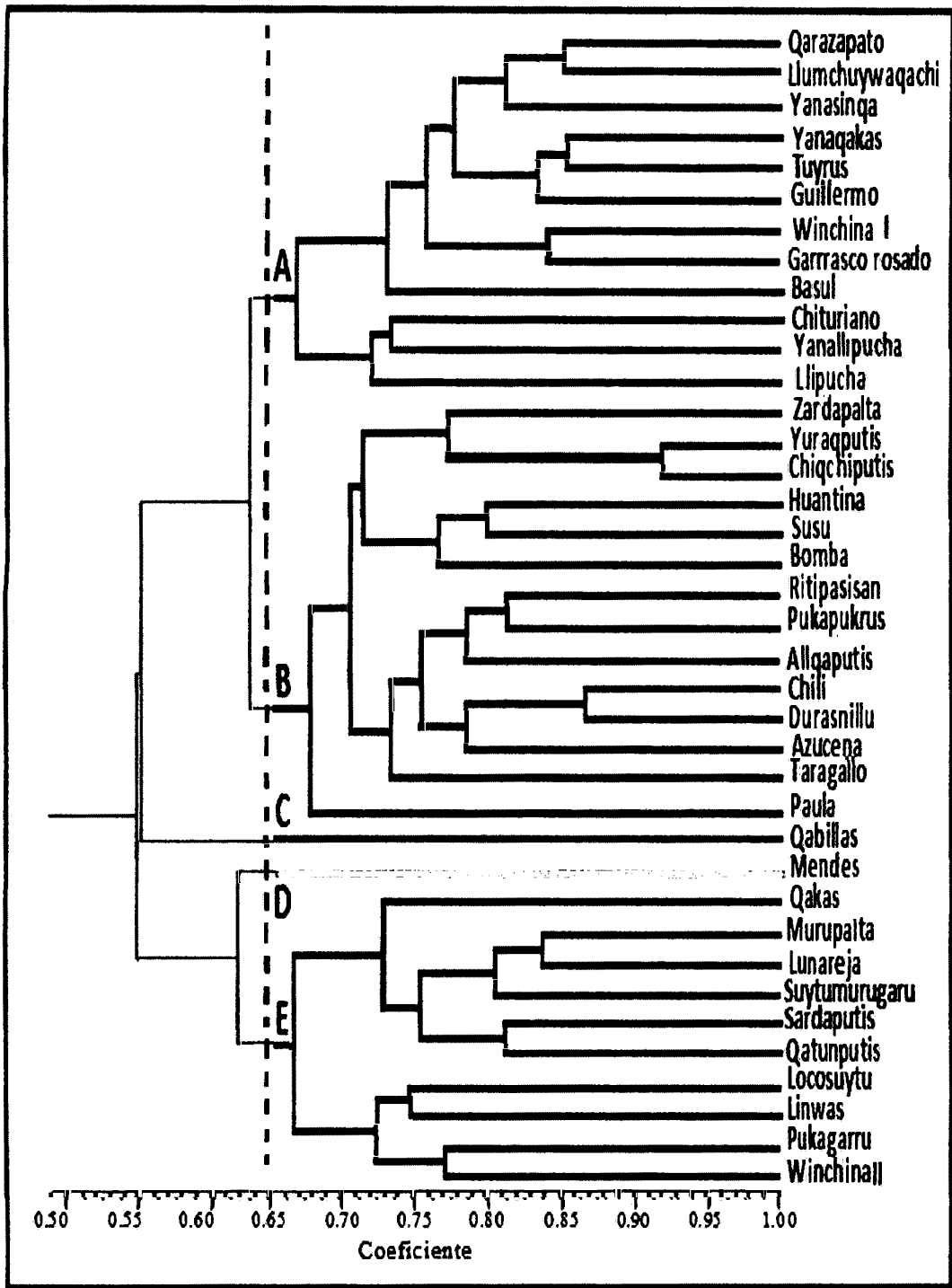


Figura Nº 11. Dendrograma de morfotipos de *Solanum* sp. "papas nativas" cultivadas en el distrito de Anco de la provincia de La Mar, empleando el coeficiente de similitud de Simple Matching (SM).

Tabla N° 11: Distribución en cinco grupos de los 38 morfotipos de papas nativas.

Anco La Mar.

GRUPOS	N° de morfotipos	Morfotipos en los diversos grupos
A	12	Qarazapato, Llumchuywaqachi, Yanasinqa, Yanaqakas, Tuyrus, Guillermo, Winchina I, Garrasco rosado, Basul, Chituriano, Yanallipucha, Lipucha.
B	14	Zardapalta, Yuraqputis, Chiqchiputis, Huantina, Susu, Bomba, Ritipasisan, Pucapukrus, Allqaputis, Chili, Durasnillu, Azucena, Taragallu, Paula.
C	1	Qabillas.
D	1	Mendes
E	10	Qakas, Murupalta, Lunareqa, Suytumurugaru, Sardaputis, Qatunputis, Locosuytu, Linwas, Pukagaru, Winchina II.

V. DISCUSIÓN

5.1. ANÁLISIS Y DETERMINACIÓN MOLECULAR

5.1.1. APLICACIÓN DE MARCADORES MOLECULARES AFLPs EN LA DETERMINACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA.

La caracterización de las papas nativas ayuda a mejorar el conocimiento de esta diversidad, así como la utilidad que pueden expresar sus atributos de resistencia a factores bióticos y abióticos y aquellos como la calidad para su consumo en fresco o procesado (Huamán y Col., 2009).

En ese sentido, la identificación tradicional de los diversos cultivares teniendo como base las características morfológicas y agronómicas ha llevado a errores en la identificaciones sobre todo en cultivares que presentan fenotipos muy similares. Por otro lado, la identidad genética de un cultivar puede modificarse debido a mutaciones somáticas perpetuas durante la reproducción vegetativa (Vignani y Col., 1996).

En muchos casos el efecto del medio ambiente enmascara el efecto producido por los genes, de manera que el fenotipo no representa el potencial genético real de la planta. El uso de marcadores moleculares superan complicaciones como las que alteran el medio ambiente en las características fenotípicas, ya que estas

tecnologías se basan directamente en el análisis del ADN (Bonamico y Col., 2004). Estos marcadores moleculares son fenotípicamente neutros, presentan mayor segregación o polimorfismo que los morfológicos, pueden ser evaluados desde los primeros estados de desarrollo de las plántulas, son aplicables a cualquier tipo de material vegetal, son independientes de la época del año en que se realiza el análisis (Powell y Col., 1996; Rallo y Col., 2002)

La tecnología de AFLPs es una técnica que exige de mucho cuidado y asepsia en cada una de las etapas a seguir. Y es necesario realizar chequeo en cada etapa del proceso desde la calidad y concentración del ADN hasta obtención de los perfiles (bandas) en la electroforesis en geles de poliacrilamida. De esta última se obtendrán los datos para su respectivo análisis.

En la Figura N° 8 se observa las diluciones del ADN genómico donde se llevó a una concentración de 50 ng/10 uL. Donde el ADN genómico inicial de la muestra indica buena calidad, así lo mismo no presenta degradación o daño molecular. Sin embargo, otros autores describen la obtención exitosa de perfiles AFLPs a partir de concentraciones no superiores de 50 ng de ADN (Liu y Col., 2003). Por otra parte Gonzales (2011) reporta que con 500 ng/uL de concentración de ADN se puede obtener perfiles de AFLP exitosos, con quién coincido. También estos resultados coinciden con el reporte de Vos y Col., (1995), quién recomienda trabajar con 500 ng de concentración de ADN de buena calidad y cantidad para la digestión.

En la Figura N° 9 se observa las etapas del procedimiento de la tecnología del AFLP. Una vez realizados las diluciones a una concentración de 50 ng/uL. El siguiente etapa es la digestión, donde se observa un barrido lo indica que la digestión enzimática fue un éxito originando fragmentos de diversos tamaños

como son: MseI – MseI, EcoRI – MseI y EcoRI – EcoRI (Vos y Col, 1995). Seguido de la etapa de ligación de adaptadores, lo cual se confirmó con la observación de bandas en geles de agarosa al 1,8 % del producto de la pre-amplificación y amplificación selectiva de los mismos. Es necesario tener en cuenta, el tiempo de corrida y el voltaje en la electroforesis, puesto que a mayor tiempo de corrida y voltaje, se corre el riesgo de perder los fragmentos y así no observar las bandas después de la tinción. Finalmente el revelado después de la corrida en geles de poliacrilamida a los productos de amplificación, es muy importante para la obtención de datos, donde registran bandas claramente definidas (Akkale y Col., 2010).

Por las consideraciones señaladas los marcadores moleculares AFLP pueden tener un gran valor en la identificación y medida de la variación pero deberían usarse con cautela para estimar las medidas reales de la similitud genética de papa (Kim y Col., 1998).

5.1.2. PODER DISCRIMINANTE Y POLIMORFISMO DE LOS AFLPs.

La generación de marcadores moleculares permitió el estudio de la diversidad genética en gran medida, puesto que la ventaja que ofrece ésta técnica, es la generación de un gran número de bandas (Vos y Col., 1995).

Existen muchos autores que coinciden en afirmar que si el enfoque del estudio es observar las diferencias a nivel molecular, mientras mayor sea el número de bandas o loci que se muestran en mayor será la confiabilidad de los resultados (Koskinen y Col., 2004). Sin embargo, en la ejecución de un estudio de este nivel se ve limitado por los recursos disponibles, como la elección de combinación de primers, así como también en el adiestramiento del manejo de la técnica.

De la Tabla N° 09 usando tres combinaciones de marcadores AFLP se generó 95 grupos de bandas claramente diferenciables, de las cuales el 79,3 % fueron polimórficas obtenidas por cada combinación de imprimadores puede ser muy variable en estudios de diversidad genética más aun tratándose *Solanum sp.* por tener nueve especies (CIP, 2010), para nuestro estudio la combinación E35 – M49 generó 27 bandas polimórficas en contraste a las 20 bandas reportadas por Gonzales (2011), esta diferencia puede deberse a varios factores como son el proceso de tinción y revelado de geles de poliacrilamida, el rango de lectura de las bandas, y el tipo de muestras, para relacionar la composición genética de la población con los procesos básicos se debe examinar los cambios en la composición de la población debidos a la inmigración de individuos procedentes de otras poblaciones (Griffiths, 2002).

5.1.3. INDICE DEL CONTENIDO POLIMORFICO (PIC)

El PIC expresa el grado de polimorfismo capaz de detectar un determinado marcador molecular (Powell y Col., 1996). Y también el (PIC) describe poder discriminatorio de una banda polimórfica dando la información de la frecuencia de un alelo entre los genotipos (Saeed y Col., 2009).

El número medio de bandas polimórficas fue 25 bandas. Sin considerar aquellas que no fueron muy legibles, debido problemas con la tinción y revelado de los geles, no siempre se puede scorear todas las bandas que se aparecen, por este motivo Gonzales (2011), reporta hasta 16 bandas por combinación. Así mismo reporta ocho bandas generadas por combinación Akkale y Col., (2010), discrepo porque las bandas generadas dependen de alguna manera de las combinaciones elegidas y el polimorfismo genético de las muestras en estudio.

De la Tabla N° 10 los valores de PIC obtenidos fueron de 0,35, 0,36 y 0,38 para la combinación de iniciadores E38 – M61, E35 – M49, E38 – M49, respectivamente con la media de 0,36. Es así que los iniciadores con mayor PIC se presentan como las más informativas para detectar la variabilidad presente en el conjunto de genotipos analizados (Bonamico y Col., 2004). Los marcadores AFLPs tienen capacidad para generar un gran número de loci polimórficos informativos (Powell y Col., 1996), simultáneamente en un solo carril con un solo primer de combinación en comparación con marcadores RAPDs, RFLPs y microsatélites (Milbourne y Col., 1997). El alto nivel de bandas polimórficas entre los genotipos utilizada en este estudio sugiere que marcadores AFLP es poderoso para la clasificación y analizó la diversidad de la papa (Zhang y Col., 2000; Saeed y Col., 2009). La combinación E38 – M49 se puede sugerir como una combinación de elección en futuras investigaciones en morfotipos papas nativas a nivel de análisis con AFLPs.

El valor del PIC aumenta a medida que el número de bandas se incrementa el índice polimorfismo (Bonamico y Col., 2004), estos estudios fueron ratificados en el estudio de la diversidad genética de *Tropaelum tuberosum* usando AFLP (Alagón y Rosas, 2008), en contraste al resultado obtenido en esta investigación el valor más alto de PIC no corresponde al mayor número de bandas, al contrario fue el menor número de bandas (Tabla N° 10), resultandos similares son reportados por Saeed (2009) y con Gonzales (2011) con quienes coincido sobre su reporte del análisis de la diversidad genética de *Solanum sp.* papas nativas que a menor número de bandas, el valor del PIC es más alto.

En este estudio la combinación E38 – M49 presento el PIC más alto, de 0,38 (Tabla N° 10). Tal es así que los iniciadores con mayor PIC se presentaron

como más informativos para detectar variabilidad genética presente en el conjunto de genotipos analizados (Bonamico y Col., 2004).

Estos resultados indican que hubo una notable diversidad genética determinados entre 38 morfotipos de papas nativas del distrito de Anco – La Mar. Ayacucho. Esto contribuirá al mantenimiento de la diversidad en programas de mejoramiento de papas e información acerca de la distribución de la diversidad genética, lo cual indica la presencia de diferentes genotipos en el distrito. Y esto es importante para el desarrollo de la conservación *in situ* y estrategias de recolección para bancos de germoplasma. Por otra parte, sobre la base del resultado de este estudio. Se puede cruzar las variedades comerciales y clones con colecciones locales, para aumentar variabilidad genética y crear nuevas poblaciones reproductoras.

5.1.4. ANÁLISIS DE SIMILARIDAD DE LA MATRIZ MEDIANTE EL COEFICIENTE COFENÉTICO “r”

La elección del coeficiente de similitud (o distancia) es una parte crucial para la estimación del nivel de relación entre los genotipos.

La desventaja de Jaccard está en la dificultad para encontrar una distribución estadística la cual es necesaria para tener un intervalo de confianza. Esta dificultad viene del denominador, el cual es una variable al azar. Para cálculos analíticos, es más fácil trabajar con distancia euclidianas como Simple Maching o la distancia euclidiana al cuadrado (Rogers, 1972).

En general los coeficientes de similitud de Dice, Jaccard y SM trabajan con datos binarios, pero las frecuencias de estados equivalentes ausentes: (0,0) que se toman en cuenta con SM considera que dos muestras deberán considerarse más

asociadas cuando comparten “unos” como “ceros”, ya que la codificación que se les asigna es indistinta (Winzery Col., 2004).

El coeficiente de similitud SM muestra clusters mas definidos que el de Jaccard y Dice, mayor índice de similitud y los que más se ajustan a los datos pasaporte (Alagón y Rosas. 2008).

Se midió el grado de concordancia entre la matriz similitud original y la matriz cofenética, obteniéndose un valor de $r = 0,7$ con lo cual coincido obtenidos por Gonzales (2011), lo cual nos demuestra que el dendograma tiene poca distorsión con respecto a los datos de la matriz original, puesto que los valores resultantes están dentro de un nivel medio adecuado (Rohlf, 1997).

5.1.5. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTO

Los morfotipos de los grupos “A” (Qarazapato, Llumchuywaqachi, Yanasinqa, Yanaqakas, Tuyrus, Guillermo, Winchina I, Garrasco rosado, Basul, Chituriano, Yanallipucha, Llipucha), el grupo “B” (Zardapalta, Yuraqputis, Chiqchiputis, Huantina, Susu, Bomba, Ritipasisan, Pucapukrus, Allqaputis, Chili, Durasnillu, Azucena, Taragallu, Paula), el grupo “C” (Qabillas), el grupo “D” (Mendes), y el grupo “E” (Qakas, Murupalta, Lunareqa, Suytumurugaru, Sardaputis, Qatunputis, Locosuytu, Linwas, Pukagaru, Winchina II), los cuáles se separan a un nivel de similitud genética de 0,65 respectivamente para Simple Matching (SM). De los cuáles comparamos a los morfotipos de yuraqputis y chiqchiputis del grupo “B”, con una similitud genética mayor de 0,92 para SM, seguida por los morfotipos de chili y duraznillu con una similitud genética de 0,87 respectivamente para SM.

El grupo “A” conformado por 14 entradas de morfotipos de papas nativas, el grupo “B” con 12 entradas de morfotipos y grupo “E” con 10 entradas de

VI. CONCLUSIONES

- a. La mejor combinación obtenida fue E38 – M49 con un PIC de 0,38 que **determinó mayor polimorfismo en las papas nativas del distrito de Anco.**
- b. **No existen duplicados de morfotipos de papas nativas en el distrito de Anco 2011.**
- c. Se determinó la diversidad genética en los morfotipos en cinco grupos genéticos: grupo A con 12 morfotipos, el grupo B con 14 morfotipos, el grupo C con un morfotipo Qabillas, el grupo D con un morfotipo Mendes y el grupo E con 10 morfotipos.

VII. RECOMENDACIONES

1. El presente trabajo de investigación permite un avance en la determinación del análisis molecular en los morfotipos papas nativas de Anco. Sin embargo, es recomendable realizar otros estudios afines como en la identificación y mapeo de AFLPs ligados al gen de resistencia a ciertos fitopatógenos.
2. Es muy importante disponer de una información debidamente organizada de la caracterización morfológica, agronómica, microbiológica, bromatológica y citogenética, que sin este conocimiento no se podría hacer uso de esta investigación, para procesos de conservación y mejoramiento genético.
3. Crear banco de germoplasma en la Escuela de Biología, para realizar nuevas investigación encaminados a la conservación y uso sostenible de los recursos genéticos que dispone nuestra región.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Akkale, C., Yildirim, Z., Yildirm, M., Kaya, C., Tanyolac, B., Ozturk, G. 2010. Assessing Genetic diversity of some potato (*Solanum tuberosum* L.) genotypes grown in turkey using the AFLP marker technique Turkish journal of field crops, 2010, 15(1). 73-78. Disponible en: <http://tarlabitkilerifdemegi.org/issues/2010-15n1/16.pdf>.
2. Alagón, T., y Rosas, R. 2008. Caracterización Molecular de Mashua (*Tropaeolum tuberosum*) de las comunidades campesinas de Cusco y Huánuco, mediante marcadores AFLPs". Escuela de Formación Profesional de Ingeniería Biotecnológica. Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Bioquímicas y Biotecnológicas. Tesis para optar título de Ingeniero Biotecnólogo. Universidad Católica de Santa María. Arequipa.
3. Alvarado, A. 2008. Caracterización fenotípica y molecular de la diversidad genética de papas cultivadas por su tolerancia al endulzamiento en frío. Escuela de Formación Profesional de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis para optar título de Biólogo en Mención: Biología Celular y Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
4. Arce, A. 2002. El cultivo de la patata 2da. Edic. Edit: Mundi-Prensa 495p.
5. Audesirk, T., Audesirk, G., Byers, E. 2004. Biología ciencia y naturaleza. 1ra. Edic. Edit: Pearson Educación. México. p193.
6. Bambeck, G. 1890. Electrophoresis separation gel and method for preparing an electrophoresis separation gel. USA. Patent number. 5589 104. 1996.
7. Becerra V. y Paredes, M. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y moleculares en estudios de diversidad genética. Agricultura técnica, 60(3): 270-281.
8. Bonamico, N., Aisassa, J., Ibañes, M., Direnzo, M., Diaz, D., Salemo, J. 2004. Caracterización y clasificación de híbridos simples de maíz con marcadores SSR. INTA. Argentina. 33(2): 129-144.
9. Botstein, D., White, R., Shoinick, M., and Davis, R. 1980. Constrction of a genetics linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. American Journal of Human Genetics. 32: 314-331.
10. Brown, D. 1989. The case for core collection. In: The use of plant genetic resources. 136 - 156. Cambridge University Press. Cambridge.
11. Centro Internacional de la Papa (CIP). 1997. Informe anual. Lima, Perú.
12. Centro Internacional de la Papa (CIP). 2002. Molecular Markers Protocols Curso-Taller. Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad.1ra. Edic. Edit: CIP. Lima, Perú.
13. Centro Internacional de la Papa CIP. 2010. Disponible en: http://cipotato.org/potato/how-potgrows/howpotatogrows?set_language.

52. Levitus, G., Echenique, V., Rubinstein, C., Mroginski, L. 2010. Biotecnología y mejoramiento vegetal II. 2da. Edic. Edit: INTA. Buenos Aires. Argentina.
53. Li, Y., Sheng, M., Liu, J., Tian, G., K., Li, Q., Wang, C., and Wu, S. 2007. Genetic diversity analysis of potato cultivars by AFLP markers, Chinese Agricultural Science Bulletin, 23(8): 58-61
54. Liu, J., Karsi, A., Li, P., Cao, D., Dunham, R. 2003. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. Genetics 165: 687-694.
55. Lodisch, H., Berk, A., Matsudaira, P., Kaiser, C., Krieger, M., Scott, M., Zipursky, S., Darnell, J. 2005. Biología Celular y Molecular. 5ta Edic. Edit: Panamericana. Argentina.
56. Miesfeld, Roger. 1999. Applied molecular genetics. Edit: Wiley-liss. USA. Disponible en: <http://www.abebooks.com/Applied-Molecular-Genetics-Miesfeld-Roger-L/>.
57. Milbourne, R., Meyer, J., Bradshaw, E., Baird, N., Bonar, J., Provan, W., Powell, R., Waugh. 1997. Comparison of PCR-based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato.127-136.
58. Mongay, F. 2005. Quimiometría. 2da. Edic. Edit: Universidad de Valencia. España.
59. Morales, M., Bermúdez, Z. 2001. Perspectivas tecnologías en el uso de germoplasma de papas nativas para el tercer milenio. Edit: departamento de capacitación y comunicación CIP. Lima, Perú.
60. Mostacero, J., y Mejía, F. 1993. Taxonomía de Fanerógamas Peruanas. 1ra. Edic. Edit: CONCYTEC. Perú.
61. National Research Council. 1989. Lost crops of the Incas: Little know plants of the Andes with promise for worldwide cultivation. National Academy Press. Washington O.C. USA.
62. Nicese, P., Hormaza, I., Mcgranahan, H. 1998. Molecular characterization and genetic relatedness among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes based on RAPD markers. Euphytica 101, 199-206.
63. Ochoa, C. 1999. Las Papas de Sudamérica: Perú (Parte 1). Allen Press, Kansas, USA.
64. Ochoa, C. 2003. Las Papas de Sudamérica. Disponible en: <http://books.google.com.pe/books?id=vHkJdCJOn8C&pg=PA20&dg=Las>
65. Ordinola, M., Bernet, T., Manrique, K. 2007. Tikapapa: Vinculando Consumidores Urbanos y Pequeños Productores Andinos con la Biodiversidad de la Papa. Centro Internacional de la Papa. Lima, Perú.

66. **Passarge, E.** 2010. *Color Atlas of Genetics*. 4ta. Edit. Edit: THIEME. New York, EE.UU.
67. **Peña, G., Tenorio, M., Vila, P., Cortez, R., Hermosa, E., León, E., Miranda, Y., Andía, V., Paniagua, J.** 2009. *Caracterización y valoración de Solanum sp "papas nativas" de los distritos de Anco y Chungui-provincia La Mar – Ayacucho*. 2008-2009.
68. **Picca, A., Helguera, M., Salomón, N., Carrera, A.** 2004. *Marcadores moleculares*. In Echenique, V. Rubinstein, C. Mroginski, L. eds. *Biotecnología y mejoramiento vegetal. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología*. Argentina, Ediciones INTA. p61-68.
69. **Powell, W. Morgante, M., Andre, C., Hanafey, M., Vogel, J., Tingey, S., Rafalski, A.** 1996. *The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis*. *Mol Breed* 2:225-238
70. **Rallo, P., Belaj, A., De La Rosa, R., Trujillo, I.** 2002. *Marcadores moleculares*. Córdoba. España. Disponible en: www.mag.go.cr/rev_meso/v17n02_221.pdf
71. **Roca, W., Manrique, I.** 2005. *Valoración de los recursos genéticos de raíces y tubérculos andinos para la nutrición y la salud*. V *Simposio de recursos genéticos para América Latina y el Caribe -Sirgelac, agrociencia 2005*. vol. IX N° 1 y N° 2 p195-201 (22 al 25 de noviembre 2005). Montevideo, Uruguay.
72. **Rogers, J.** 1972. *Measures of similarity and genetic distance*. *Studies in genetic VII*. U. Texas Publ. 7213: 145-153p.
73. **Rohlf, J.** 1997. *NTSYS-pc 2.1. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Setauket, NY: Exeter Software. Disponible en: http://agrobiol.sggw.waw.pl/~cbcs/articles/CBCS_2_1_6.pdf
74. **Rohlf, J., and Sneath.** 1962. *Memorandum on computer programming for numerical taxonomy*. *Taxometrics* N° 2. p5.
75. **Rohlf, J.** 1970. *NTSYS-pc. Numeral Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 2.1*. Department of ecology and evolution state university of New York. *A single domestication for potato based on multilocus amplified fragment length polymorphism genotyping*. *Proceedings National Academy of Sciences (PNAS) (USA)*. ISSN 0027-8424. 2005. 102(41): 14694-14699.
76. **Saeed, T., Shiran, B., Balali, G.** 2009. *AFLP markers for the assessment of genetic diversity in European and North American potato varieties cultivated in Iran*. *Crop Breed. and App. Biotech.*, 9: 75-86.
77. **Sambrook, J., y Russell, D.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 3ra. Edic. Edit: Cold Spring Harbor Laboratories. Nueva York. USA. 2344p.
78. **Senior, L, Murphy, P., Goodman, M., Stuber, W.** 1998. *Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system*. *Crop Sci*. 38: 1088-1098.

79. **Sevilla, R., Holle, M.** 2004. Recursos genéticos vegetales. Luis León Asociados S.R.L. 445p.
80. **Simpson, J.** 1997. Amplified fragment length polymorphisms. *Bol. Soc. Bot. México.* 60:73-76.
81. **Sneath, A., y Sokal, R.** 1973. Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification. San Francisco, USA. 573p. Disponible en: <http://www.garfield.library.upenn.edu/classics1987/A1987F27280001.pdf>
82. **Solano, J., Morales, D., Anabalon, L.** 2007. Molecular description and similarity relationships among native germplasm potatoes (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum* L.) Using. Disponible en: <http://www.scielo.cl/scielo.php?pid=S071734582007000300011&script=sc>
83. **Starr, M.** 1997. Assignee, Utilization of additives and defined storage systems to increase the stability and performance of electrophoresis media US patent 5 660 702.
84. **Stewart, J., Via, L.** 1993. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *BioTechniques* 14:748-751
85. **Stolovitzki, G., y Cecchi, G.** 1996. Efficiency of DNA replication in the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 12947-12952
86. **Terrazas, F., y Valdivia, G.** 1999. Una experiencia metodológica en la identificación y caracterización de microcentros de biodiversidad en la región de Cochabamba, Bolivia. 1ra. Edic. Edit: CIP-CONDESAN. Lima. Perú.
87. **Torres, E., Moreno, S.** 2001. Conservación y caracterización de recursos fitogenéticos. 1ra. Edic. Edit: Publicaciones I.N.E.A. Valladolid. España.
88. **Trujillo, G.** 2004. Desarrollo de marcadores SCAR y CAPS en un QTL con efecto importante sobre la resistencia al tizón tardío de la papa. Escuela de Formación Profesional de Biología. Facultad de Ciencias Biológicas. Tesis para optar título de Biólogo en mención Genética. Universidad Nacional Mayor de San Marcos.
89. **Túpac, Y.** 2001. Postcosecha y comercialización de tubérculos andinos con énfasis en papas nativas y ulluco. PERSPECTIVAS tecnológicas en el uso de germoplasma de papas nativas. Ministerio de Agricultura del Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria (INIA) Centro Internacional de la Papa (CIP) Agosto de 2001.
90. **Valadez, E., y Kahl, G.** 2005. Huellas de ADN de genomas de plantas, (teoría y protocolo del laboratorio). 1ra. Edic. Edit: Mundi-Prensa. México.
91. **Vermerris, W., y Gainesville, F.** 2008. Genetic Improvement of Bioenergy Crops, 1ra. Edic. Edit: Springer-Science-Business-University of Florida. USA.

92. Villardón, V. 2000. Introducción al análisis de clúster. Departamento de Estadística. Universidad de Salamanca. Disponible en: biplot.usal.es/ALUMNOS/CIENCIAS/2ESTADISTICA/.../cluster.pdf
93. Vignani, R., Bowers, and Meredith. P. 1996. Microsatellite DNA polymorphism analysis of clones of *Vitis vinifera* "Sangiovese". *Scientia Hort.* 65:163-169.
94. Von, F. 2003. Factors affecting the genotypic and genetic diversity of the dioecious clonal plant *Cirsium arvense* at the metapopulation level. *Zur Erlangung des akades.* Disponible en: <http://sundoc.bibliothek.uni-halle.de/diss-online/03/04A298/prom.pdf>
95. Vos, P., Hogers, R., Bleeker, M., Reijans, M., VanDe L., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Poleman, J., Kuiper, M., Zabeau, M. 1995. AFLP®: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407- 4414.
96. Vreugdenhil, J., Bradshaw, C., Gebhardt, F., Govers, D., MacKerron, A., Taylor, A., Heather. 2007. *Potatobiology and biotechnology: Advances and perspectives.* Elsevier, Amsterdam.
97. Winzer, D., Renzo, M., Olmos, S. 2004. *Métodos para estimar la variabilidad genética. Biotecnología y mejoramiento vegetal.* Edit: INTA. Argentina.
98. Yamamoto, A. 1988. Potato processing learning from a traditional Andean system. En: *The Social Sciences at CIP. Report of the Third Social Science Planning Conference, September, 7-10.* Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú.
99. Zhang, P., Cervantes, Huamán, Z., Carey, E., y Ghislain, M. 2000. Assessing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.). Cultivars from tropical America using AFLP. *Genet. Resources Crop Evolution* 47, 659-665.

ANEXOS

ANEXO Nº 1

DATOS PASAPORTE DE 38 MORFOTIPOS DE PAPAS NATIVAS DEL DISTRITO DE ANCO Y SUS COMUNIADAS

Nº	NOMBRE COMÚN	LOCALIDAD	LUGAR DE SIEMBRA	DISTRITO	RECOLECTORES
1	Qarazapato	Huarcca	Moroqocha	Anco	Marcelino Carhuas Solier
2	Qabillas	Huarcca	Moroqocha	Anco	
3	Zardapalta	Huarcca	Moroqocha	Anco	
4	Mendes	Huarcca	Moroqocha	Anco	
5	Llumchuywaqachi	Huarcca	Moroqocha	Anco	
6	Yuraqputis	Huarcca	Moroqocha	Anco	
7	Ritipasisan	Huarcca	Moroqocha	Anco	
8	Huantina	Huarcca	Moroqocha	Anco	
9	Chiqchiputis	Huarcca	Moroqocha	Anco	
10	Susu	Huarcca	Moroqocha	Anco	
11	Taragallu	Huarcca	Moroqocha	Anco	
12	Allqaputis	Huarcca	Moroqocha	Anco	
13	pukapukrus	Huarcca	Moroqocha	Anco	
14	Chili	Huarcca	Moroqocha	Anco	
15	Bomba	Huarcca	Moroqocha	Anco	
16	Durasnillu	Huarcca	Moroqocha	Anco	
17	Yanaqakas	Huarcca	Moroqocha	Anco	
18	Chituriano	Huarcca	Moroqocha	Anco	
19	Guillermo	Huarcca	Moroqocha	Anco	
20	Tuyrus	Huarcca	Moroqocha	Anco	
21	Azucena	Huarcca	Moroqocha	Anco	
22	Yanallipucha	Huarcca	Moroqocha	Anco	
23	Paula	Huarcca	Moroqocha	Anco	
24	Llipucha	Auquiraccai	Llanamachayccasa	Anco	
25	Basul	Auquiraccai	Llanamachayccasa	Anco	
26	Qakas	Auquiraccai	Llanamachayccasa	Anco	
27	Winchina I	Auquiraccai	Llanamachayccasa	Anco	
28	Muru palta	Paco bamba	Pacobamaba*	Anco	Herminio Mendez
29	Yanasinqa	Paco bamba	Pacobamaba*	Anco	
30	Locosuytu	Anco	Punpuray	Anco	
31	Sardaputis	Oscoccocha		Anco	
32	Qatunputis	Huayllahura	Canchacancha	Anco	Apolinaria Meneses
33	Garrasco rosado	Huayllahura	Canchacancha	Anco	
34	Suytu muru garu	Huayllahura	Canchacancha	Anco	
35	Lunareja	Huayllahura	Canchacancha	Anco	
36	Pukagarru	Huayllahura	Canchacancha	Anco	
37	Winchina II	Huayllahura	Canchacancha	Anco	
38	Linwas	Huayllahura	Canchacancha	Anco	

ANEXO N°3

Protocolo de extracción de ADN genómico, método CTAB modificado (CIP, 1997)

1. Se procedió a pesar 200 mg de tejido fresco (específicamente hojas jóvenes), congeladas a -20 °C.
2. Triturar la muestra en un mortero pre-congelado, utilizando 1400 uL de tampón CTAB 2 X, hasta obtener un polvo fino. Ahora transferir a dos tubos Eppendorf nuevo y esterilizados, aproximadamente 700 uL de muestra.

Buffer de extracción CTAB 2X

Reactivo stock	CC. Final	100 mL
CTAB	2 %	2,0 g
NaCl 5M	1,4 M	28 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20 mM	4,0 mL
Tris: HCl 1 M (pH 8,0)	100 mM	10 mL
PVP	1 %	1,0 mL
Agua bidestilada H ₂ O		100 mL

3. Luego adicionar de inmediato 2 uL de β -mercaptoetanol en campana de extractora de aire. Agitar en vortex o a mano bien. Incubar las muestras en baño maría a 65 °C por 45 min, agitar suavemente las muestras cada 15 min. Luego se procedió a enfriar los tubos a temperatura ambiente 25 °C aprox. por 4 a 5 minutos.
4. Agregar 670 uL de cloroformo y alcohol isoamílico de 30 uL. En proporción de (24:1) a cada tubo. Mezclar en inversión para evitar dañar el ADN.
5. Centrifugar las muestras a 14000 r.p.m. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf esterilizado. Tener cuidado de absorber la interfase. Descartar el cloroformo/alcohol isoamílico remanente. Mantener los tubos invertidos y abiertos sobre un papel absorbente, para que se evapore el cloroformo/isoamílico residual.

6. Agregar 50 uL de tampón CTAB 10 X, agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.

Buffer de extracción CTAB 10X

Reactivos	CC. Final	100 mL
CTAB	10 %	10 g
NaCl 5M	0,7 M	14 mL
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	2 mM	4 mL
Tris: HCl 1 M (pH 8,0)	100 mM	10 mL
Agua bidestilada H ₂ O		72 mL

7. Repetir los pasos 4 y 5.
8. Agregar 400 - 500 uL de isopropanol frío a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejarlos en refrigeración a -20 °C 15 min.
- Alternativa: Si no desea continuar dejar a -20 °C toda la noche, sin ningún problema alguno.
9. Centrifugar las muestras a 14000 r.p.m. durante 20 min. Eliminar cuidadosamente el sobrenadante para no perder el precipitado de ADN. Dejar secar el precipitado invirtiendo los tubos abiertos por unos 2 min.
10. Lavar el precipitado de ADN en un 1 mL de etanol al 70 % (por 3 min.), centrifugar las muestras a 13000 r.p.m. durante 15 min. Eliminar con cuidado el etanol y agregar 1 mL de etanol al 90 %, centrifugar las muestras a 13000 r.p.m. durante 15 min y eliminar el etanol. Dejar secar el precipitado de 20 - 30 min dejándolos los tubos abiertos invertidos, sobre papel absorbente.
11. Disolver el precipitado de ADN en 50 uL a 100 uL de TE o H₂O, agregar 2 uL de ARNasa - libre de ADNasa (10 mg/mL) agitar suavemente e incubar a 37 °C por más de 12 horas.
- Alternativa: El TE o H₂O, se agrega dependiendo del tamaño del ADN precipitado que se observa en el tubo.
12. Almacenar las muestras en congelación a -20 °C ó 4 °C.

ANEXO N°4

Protocolo para determinar la concentración de ADN (Molecular Markers Protocols Curso -Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad CIP, 2002)

1. Se preparó agarosa al 1 % (2,8 g de agarosa en 280 mL de tampón TBE 1 X), en un beakers. Luego la solución se disolvió por un tiempo de 2 min, 2 min. Consecutivamente, en un Horno microondas (Samsung), hasta que sea homogénea.

Tampón TBE 10 X

Reactivos stock	CC. Final	1 L
Tris:base	0,9M	108 g
Ácido bórico	0,9M	55g
EDTA 0,5 M (pH 8,0)	20mM	40mL
Agua bidestilada H ₂ Odd		1000 mL

2. Previamente enfriada la agarosa en el caño con agua a chorro se llevó a la cámara de electroforesis horizontal, donde se le agregó 1 uL de bromuro de Etidio al beakers conteniendo gel.
3. Se tomó 2 uL del ADN resuspendido y se diluyó en 8 uL de tampón de carga (Blue Juice). Las muestras fueron cargadas en los pocillos de gel de agarosa y en los pocillos centrales del gel se cargó 10 uL del marcador (λ). (el cual muestra la primera banda a una concentración de 280 ng/uL).

Tampón de carga (Blue Juice)

Reactivos stock	CC. Final	100 mL
Glicerol 100 %	70 %	70mL
NEB 10 X	0,5X	5mL
EDTA0,25M	20mM	10 mL
SDS 20 %	0,2 %	1 mL
Azul de Bromofenol	0,25 %	0,25g
Agua bidestilada H ₂ Odd		100mL

ANEXO N°6

Ligación de adaptadores (Molecular Markers Protocols Curso-Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad CIP, 2002)

Prepare un stock de 10 uM del adaptador con EcoRI forward y reverse, adicionar 80 uL de agua Milli-Q.

Preparación de EcoRI Adapter (10 uM)

Reactivos stock	CC. Final	100 rxs
H ₂ O Milli-Q		80uL
EcoRI Adapter 1 (100 uM)	10 uM	10 uL
EcoRI Adapter 2 (100 uM)	10 uM	10 uL
Volumen total:		100 uL

1. Prepare un stock de 50 uM del Adapter con MseI forward y reverse.

Preparación de MseI Adapter (50 uM)

Reactivos stock	CC. Final	100 rxs
MseI adapter 1 (100 uM)	50uM	50 uL
MseI adapter 2 (100 uM)	50uM	50 uL
Volumen total		100uL

2. Alinear los adaptadores para producir doble hebra. Las condiciones es como sigue:
3. Llevar al Termociclador a 65 °C por 5 min. Luego sacar y dejar tome temperatura ambiente por 30 min. Luego, almacenar a -20 °C.

ANEXO N°7

Reacción de ligación (Molecular Markers Protocols Curso-Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la Conservación y manejo de la agrobiodiversidad CIP, 2002)

1. Agregar 5 uL del MMx de ligación a los 20 uL anteriores del ADN digerido. Dar un spin down por aprox. de 10 s.

Mix de ligación

Reactivos stock	CC. final	1 rx	47 rxs
H ₂ O Milli-Q		0,6 uL	28,2 uL
Buffer 5 XT ₄		5 uL	235uL
Adapter MseI (100 uM)	5 uM	1 uL	47uL
Adapter EcoRI (100 uM)	100 uM	1 uL	47 uL
T4 DNA ligasa		0,4 uL	18,8 uL
ADN digerido		20uL	————
Volumen total:		28 uL	376 uL

2. Incubar los tubos a temperatura ambiente (20 °C) toda la noche.
3. Almacenar las muestras a -20 °C hasta realizar la pre-amplificación.

ANEXO N° 8

Pre-amplificación (00/00) (Molecular Markers Protocols Curso-Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad CIP, 2002)

1. Sacar y descongelar la muestra D/L a temperatura ambiente, hasta descongelar, luego dispensar 20 uL de muestra de ADN digerido/ligado a los tubos de tiras de PCR. (todo esto sobre hielo)
2. De inmediato preparar, el MMx. Antes de dispensar a los tubos de tiras PCR, dar un spin down de 10 a 15 segundos.
3. Añadir 20 uL de MMx, a los tubos PCR que contienen la muestra D/L, (evitar producir burbujas al dispensar).

MIX DE PRE - AMPLIFICACIÓN

Reactivos stock	CC. final	1 rx	47 rxs
H ₂ O Milli-Q		12,55 uL	577,3 uL
Buffer 10 X	10 X	2,5 uL	115 uL
dNTPs (100 uM)	5 mM	1,25 uL	57,5 uL
Primer E- 00 (1000 ng/uL)	50 ug/uL	1 uL	46 uL
Primer M-00 (1000 ng/uL)	50 ug/uL	1 uL	46 uL
MgCl ₂ (25 Mm)	25 mM	1,5 uL	69 uL
Taq polimerase		0,2 uL	9,2 uL
ADN D/L (1:5)		5 uL	-----
Volumen total:		25 uL	920 uL

4. Ahora dar un spin down de 10 s y amplificar según el programa de temperatura y tiempo correspondiente en el Termociclador.

Nota: Fíjese si puso tapa caliente (heated lid) 105 °C en el programa del termociclador, esto para evitar la evaporación de la muestra. Para aquellos en que no se usa aceite mineral.

5. Chequear en agarosa al 1,2 % los resultados de pre-amplificación.
(muy importante para continuar).
6. Almacenar las muestras a – 20 °C. hasta el siguiente PCR.

ANEXO N°9

Amplificación selectiva (+3/+3) (Molecular Markers Protocols Curso-Taller: Aplicaciones de los marcadores moleculares en la conservación y manejo de la agrobiodiversidad CIP, 2002)

1. Sacar y descongelar la muestra pre-amplificada a temperatura ambiente, hasta descongelar, luego dispensar 2 uL de muestra de ADN pre-amplificado directo, a los tubos de tiras de PCR (todo esto sobre hielo).

MIX DE AMPLIFICACIÓN SELECTIVA

Reactivos stock	CC. Final	1 rxs	48 rxs
H ₂ O Milli-Q		3,35 uL	160,8 uL
Buffer 10 X		1,1 uL	52,8 uL
dNTPs (100 mM)	5 mM	0,6 uL	28,8 uL
Primer E +3 (1000 ng/uL)	50 ug/uL	2 uL	96 uL
Primer M +3 (1000 ng/uL)	50 ug/uL	0,3 uL	14,4 uL
MgCl ₂ (25 mM)	25mM	0,6 uL	28,8 uL
Taq polimerase		0,15 uL	7,2 uL
ADN Pre-Amplificado		2 uL	-----
Volumen Total:		10 uL	388,8 uL

2. De inmediato preparar, el MMx. antes de dispensar a los tubos de tiras PCR, dar un spin down de 10 a 15 segundos.
3. Añadir 8 uL de MMx, a los tubos PCR que contienen la muestra D/L, (evitar producir burbujas al dispensar).
4. Ahora dar un sping dow de 10 segundos y amplificar según el programa de temperatura y tiempo correspondiente en el termociclador.

5. Almacenar las muestras si no son utilizadas para electroforesis a -20 °C.

SECUENCIAS DE LOS INICIADORES AFLP

Nombre	Enzima	Tipo	Secuencia (5'–3')
E35	EcoRI	Primer+ 3	5'-GACTGCGTACCAATTCACA–3'
E37	EcoRI	Primer+ 3	5'-GACTGCGTACCAATTCACG–3'
E38	EcoRI	Primer+ 3	5'-GACTGCGTACCAATTCACT–3'
E45	EcoRI	Primer+ 3	5'–GACTGCGTACCAATTCATG–3'
M49	MseI	Primer+ 3	5'–GATGAGTCCTGAGTAACAG–3'
M50	MseI	Primer+ 3	5'–GATGAGTCCTGAGTAACAT–3'
M61	MseI	Primer+ 3	5'–GATGAGTCCTGAGTAACTG–3'

Luego colocar ganchos a los bordes para asegurar y a la vez con cinta adhesiva asegurar los bordes (para evitar derrame del gel poliacrilamida al momento de cargado).

- **Preparación del gel de poliacrilamida**

1. Prepara la siguiente mezcla.

Reactivos	CC. Final	60 mL
Sol. poliacrilamida	6 %	60 mL
TEMED	6 %	36 uL
Persulfato de amonio (APS)	10 %	36 uL

Persulfato de Amonio (APS 10 %)

Reactivos	CC. Final	1 mL
APS	10 %	0,1 mg
H ₂ O Milli-Q		1 mL

2. La mezcla debe hacerse rápidamente con suavidad, para evitar la formación de burbujas.
3. Verter suavemente la solución de poliacrilamida a la cámara.
4. Introducir el peine entre el vidrio pequeño y la cámara (vidrio grande) para formar el límite de los espacios donde se vierte las muestras.
5. Dejar polimerizar al ambiente por 2 horas o toda la noche sin ningún problema.

- **Pre - corrida del gel de poliacrilamida**

1. Retirar la cinta adhesiva y lavar el vidrio con agua milli-Q a nivel del frente de corrida.
2. Retira el peine.

3. Colocar la cámara sobre la cubeta (ánodo) o llenarla de tampón de corrida TBE 0,5 X (2 L de buffer TBE).
4. Conectar la cámara (cátodo) a la fuente de poder (1600 V, mA, W).
5. Pre-correr el gel por 30 minutos.
6. Detener la fuente de poder y limpiar el frente de corrida de restos de urea, poliacrilamida y burbujas.
7. Colocar el peine con los dientes hacia abajo para formar los pozos.

ELECTROFORESIS

1. Simultáneamente cuando el gel está pre-coriendo, a cada una de las reacciones de amplificación agregar el 50 % (del volumen amplificado) de tampón de carga (DyE).
2. Desnaturalizar las muestras a 95 °C durante 5 minutos.
3. Detener la reacción colocando las muestras en hielo hasta el momento de servir la muestra en el gel.
4. Una vez detenida la pre-corrída, cargar con una micropipeta 5 uL de cada muestra de ADN (amplicones) en cada uno de los pozos (creados por el peine) en gel de la poliacrilamida.
5. Servir en los pozos del medio y extremos de 3,5 uL del ADN Ladder. Para identificar el tamaño de los productos de PCR, utilizar un patrón de peso molecular 10 pb DNA Ladder, que tiene un rango de lectura de 300 a 100 pb.
6. Realizar la electroforesis durante 4 horas a 1600 v o 16 horas a 450 v, aproximadamente (hasta que el tampón de carga esté a la altura de las perillas de la cámara).

mM	Milimolar
MMx	Mastermix
m.s.n.m	Metros sobre nivel del mar
ng	Nanogramo
NCBI	National Center for Biotechnology Information
pb	Pares de bases
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PIC	Polymorphism Index Content (Índice del Contenido Polimórfico)
PVP	Polyvinilpirrolidone (Poli Vinil Pirrolidona)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)
RAPD	Random Amplification of Polymorphic DNA (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico)
rpm	Revoluciones por minuto
SSR	Simple Sequence Repeats (Secuencias simples repetidas)
SM	Simple Matching (concordancia simple)
T4 ADN Ligasa	ADN ligasa del bacteriófago T4
Taq polimerasa	Termus aquaticus ADN polimerasa
TBE	Tris-Borato-Edta
ug	Microgramo
uL	Microlitro
uMol	Micromol
UNSCH	Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga
UNALM	Universidad Nacional Agraria La Molina

ANEXO 12. MATRIZ DE CONSISTENCIA

TÍTULO	PROBLEMA	OBJETIVOS	MARCO TEÓRICO	VARIABLES E INDICADORES	METODOLOGÍA
<p>Determinación de la diversidad genética en morfotipos de "papas nativas" mediante marcadores AFLPs del distrito de Anco, provincia La Mar Ayacucho, 2011.</p>	<p>¿Cuál será la diversidad genética en morfotipos de "papas nativas" mediante marcadores AFLPs del distrito de Anco, provincia La Mar - Ayacucho, 2011?</p>	<p>1.-GENERAL - Determinar la diversidad genética en morfotipos de "papas nativas" mediante marcadores AFLPs del distrito de Anco, provincia La Mar - Ayacucho 2011. 2.- ESPECÍFICOS -Determinar la mejor combinación de "primers" que determinen mayor polimorfismo en las papas nativas. -Determinar la existencia o no de morfotipos duplicados de papas nativas. -Determinar los grupos genéticos de papas nativas.</p>	<p>ANTECEDENTES - Papa nativas. - Morfotipo. - Papa silvestre. - Taxonomía. - Variabilidad en papa. - Diversidad genética en papas nativas. - Variación genética. - Marcadores Moleculares. - Análisis de diversidad genéticas mediante AFLP. - Polimorfismo. - Determinación de calidad y concentración de ADN.</p>	<p>a. VARIABLE PRINCIPAL: - Morfotipos de "papas nativas" Indicador: Marcadores moleculares de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados. b. VARIABLE SECUNDARIO: - Diversidad genética de "papas nativas" Indicador: Marcador molecular del polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados.</p>	<p>- Extracción del ADN genómico. - Determinación de calidad y concentración de ADN. - Evaluación de AFLP. - Digestión del ADN genómico. - Ligación de adaptadores. - Pre-amplificación de los fragmentos digeridos. - Amplificación selectiva de los fragmentos digeridos. - Corrida de electroforesis vertical. - Revelado de las bandas en el gel de poliacrilamida. - Escoreo de las bandas (presencia/ausencia) - Análisis de resultados. - los polimorfismos detectados serán analizados en el paquete estadístico NTSYS-pc 2.1 Con el coeficiente de S.M.</p>

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

R.D. N° 004-13-FCB-D

Bach. Yuri Gamboa Bendezú

En la ciudad de Ayacucho, siendo las cuatro con diez minutos del día veintidós de marzo del dos mil trece, en el Auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas bajo la presidencia del Dr. Tomas Castro Carranza Decano de la Facultad de Ciencias Biológicas, se reunieron los miembros jurados Mg. Jesús De La Cruz Arango (miembro), Mg. Martín Tenorio Bautista (miembro), Mg. Gilmar Peña Rojas (miembro - asesor), Mg. Yuret Miranda Tomasevich (miembro), actuando como secretario docente la Mg. Marta Romero Viacava, para recepcionar la sustentación de la tesis titulada: "Determinación de la diversidad genética mediante marcadores AFLPs en morfotipos de papas nativas del distrito de Anco, provincia La Mar-Ayacucho 2011" presentado por el Bachiller Yuri Gamboa Bendezú, con la que pretende optar el Título profesional de Biólogo con mención en la especialidad de Microbiología.

Se da inicio al acto de sustentación, el presidente de la comisión evaluadora inscrito a la secretaria docente a dar lectura de la documentación correspondiente, luego del cual dio las pautas básicas al sustentante, para que pueda exponer su trabajo de investigación un tiempo no mayor de 45 minutos.


Culminado la exposición del trabajo se dio inicio a la segunda etapa del acto académico, en la que el presidente invitó a los docentes miembros jurados a iniciar con sus observaciones aclaraciones y/o preguntas. A fin de ser respondidas por el sustentante.

Finalizada esta etapa, el presidente de la comisión invitó al sustentante y al público asistente a retirarse momentáneamente del auditorio a fin de que los miembros del jurado puedan deliberar en privado la calificación, obteniéndose las siguientes calificaciones:

Jurado Calificador	Exposición	Respuesta	Promedios
Mg. Jesús De La Cruz Arango	17	17	17
Mg. Martín Tenorio Bautista	17	17	17
Mg. Gilmar Peña Rojas	18	17	18
Mg. Yuret Miranda Tomasevich	17	16	17
		Promedio	17

De la evaluación realizada por el jurado calificador el sustentante. Obtuvo la calificación promedio final de diecisiete (17), de lo cual dan fé los miembros del jurado calificador estampando sus firmas al pie del presente.


Concluyendo el acto de sustentación siendo 6.18 de la noche.



Dr. Tomás Castro Carranza
Presidente - Jurado



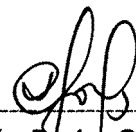
Mg. Martín Tenorio Bautista
Miembro - Jurado



Mg. Gilmar Peña Rojas
Miembro - Asesor



Mg. Yuret Miranda Tomasevich
Miembro - Jurado



Mg. Jesús De La Cruz Arango
Miembro - Jurado



Mg. Marta Romero Viacava
Secretaria - Docente