

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTÓBAL  
DE HUAMANGA**

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ESCUELA DE FORMACIÓN PROFESIONAL DE BIOLOGÍA**



**Análisis de la diversidad genética de *Solanum sp.*  
“papas nativas” mediante Polimorfismo en la  
Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) del  
distrito de Chungui, provincia La Mar - Ayacucho.  
2009-2010.**

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

**CON MENCIÓN EN LA ESPECIALIDAD  
DE MICROBIOLOGÍA**

**PRESENTADO POR:**

**Bach. GONZALES MAMANI, JUAN CARLOS**

**AYACUCHO, PERÚ**

**2011**

*Con todo el cariño de siempre a Flor  
Maritza mi hermana y a Delia  
Marina mi sobrina, quienes son el  
motor que me impulsa a seguir  
adelante.*

## AGRADECIMIENTOS

A nuestra *alma mater*, la Universidad Nacional San Cristóbal de Huamanga, en cuyas aulas adquirí los conocimientos que permitieron mi formación profesional que hoy encaminan mi destino.

Al financiamiento del CONCYTEC que permitió la ejecución del presente trabajo de investigación.

A los miembros del Laboratorio de Biología Molecular del INIA – Lima.

A los miembros del IBT de la UNALM, por compartir sus conocimientos acompañados de trato con calor familiar.

Deseo hacer extensivo este agradecimiento a los comuneros de la localidad de Unión Libertad del distrito de Chungui, por confiar en nosotros en todo momento.

Al Mg. Bigo. Gilmar Peña Rojas, por haberme brindado las facilidades para la ejecución de la presente tesis.

Al PhD. Raúl Humberto Bias Sevillano, por la confianza, consejos y orientaciones.

Al Mg. Bigo. Jorge Benavides Revilla, por los consejos y su brillante dirección, porque en los momentos difíciles, apostó por este trabajo.

Al Bigo. Reynan Condor Alarcón por la ayuda en el análisis estadístico.

A Luis Gutiérrez Walhoff, y amigos todos por su ayuda.

**Título:** Análisis de la diversidad genética de *Solanum spp.* "papas nativas" mediante Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) del distrito de Chungui, provincia La Mar - Ayacucho. 2009-2010.

**Autor:** Bach. Juan Carlos Gonzales Mamani

**Asesor:** Mg. Gilmar Peña Rojas

## **RESUMEN**

Con el objetivo de evaluar la diversidad genética de papas nativas de la localidad de Rumichaca de la provincia La Mar del departamento de Ayacucho, se colectaron 25 morfotipos de papas nativas los cuales fueron introducidos y micro propagados en el medio de cultivo base Murashigue Skoog. La extracción de ADN se procedió a partir de material vegetal joven de 2 a 3 semanas que permitió utilizar la técnica de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP). La digestión enzimática del ADN fue con EcoRI (Fermentas) y MseI (Invitrogen). Se emplearon tres combinaciones de iniciadores AFLP con tres nucleótidos selectivos, originándose un total de 85 bandas claramente diferenciales de las cuales 63 (73%) fueron polimórficas. La combinación E37 – M50 fue la más informativa obteniendo un índice de contenido polimórfico de 0.43. La lectura de la presencia o ausencia de marcadores AFLP permitió evaluar la similitud genética empleando el coeficiente de Simple Matching y el análisis de agrupamiento según el algoritmo UPGMA originando un dendograma con un índice de correlación cofenética de 0.7. El dendograma con un coeficiente de similitud de 0.64 agrupó a los morfotipos de papas nativas del distrito de Chungui en 4 grupos genéticos diferentes no encontrándose morfotipos duplicados a pesar de tener algunas características morfológicas muy semejantes. Estos resultados demuestran el alto poder informativo de los marcadores AFLP en el análisis de la diversidad genética de papas nativas.

**Palabras clave:** AFLP, diversidad genética, papas nativas.

	<b>ÍNDICE</b>	<b>Página</b>
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	PAPA NATIVA	3
2.2.	DIVERSIDAD GENÉTICA	14
2.3.	CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA	21
2.3.5.	MARCADORES MOLECULARES	29
2.4.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	33
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
3.1.	MATERIALES	44
3.4.	MÉTODOLOGÍA	50
3.4.1.	COLECTA DE LAS MUESTRAS	50
3.4.2.	EXTRACCIÓN DE ADN	50
3.4.3.	DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN	50
3.4.4.	TÉCNICA DE AFLP	51
3.4.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	55
IV.	RESULTADOS	58
V.	DISCUSIÓN	66
VI.	CONCLUSIONES	73
VIII.	RECOMENDACIONES	74
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	75
	ANEXO	82

## **CAPÍTULO I.**

### **INTRODUCCIÓN**

El Perú es el país de mayor diversidad genética de papas silvestres y cultivadas, razón por la cual se estableció en Lima el Centro Internacional de la Papa (CIP). Nuestra región constituye una gran reserva de papas silvestres y cultivadas, en el caso de papas cultivadas encontramos a las papas nativas que son producidas de manera natural y que están adaptadas a condiciones ambientales específicas, por otro lado las papas nativas constituyen un invaluable recurso que es conservado y mantenido por los campesinos andinos de generación en generación. Históricamente los cultivares de papa han sido discriminados e identificados a través del uso de varias características morfológicas como son: el tipo de tubérculo, tipo de hoja, color de la flor, apariencia del brote, tipo de crecimiento y el comportamiento ante enfermedades; sin embargo, muchos de estos caracteres pueden variar drásticamente con las condiciones ambientales, por lo que en muchos casos el efecto del ambiente enmascara el efecto producido por los genes, de manera que el fenotipo no representa el potencial genético real de la planta.

El estudio de la diversidad genética de papas nativas mediante el empleo de marcadores moleculares como la técnica de polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) nos permite obtener una identidad molecular del ADN de cada morfotipo de papa nativa con el que se puede evaluar varios aspectos como son: la diversidad genética, la existencia o no de morfotipos duplicados, la distancia o similitud genética, entre otros. La técnica hace uso de la sensibilidad de las enzimas de restricción y el poder del PCR en la amplificación de fragmentos de ADN generando así un gran número de marcadores moleculares.

Por las consideraciones señaladas, el presente estudio pretende contribuir en determinar la utilidad de la técnica AFLP para el análisis de la diversidad en *Solanum sp* "papas nativas" del distrito de Chungui de la provincia de La Mar del departamento de Ayacucho 2009 - 2010. El objetivo general del trabajo de investigación consistió en:

Analizar la diversidad genética de *Solanum sp* "papas nativas" mediante el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) de Chungui de la provincia La Mar del departamento de Ayacucho. Los objetivos específicos fueron los siguientes:

- ❖ Determinar la combinación de iniciadores más informativos para el análisis de la diversidad genética de papas nativas.
- ❖ Determinar el índice de correlación cofenética del análisis de agrupamiento genético.
- ❖ Determinar la existencia o no de morfotipos duplicados de papas nativas.
- ❖ Determinar los grupos genéticos de papas nativas.

## **CAPÍTULO II.**

### **MARCO TEÓRICO**

#### **2.1. PAPA NATIVA**

La diversidad genética de las papas nativas, hacen que las mismas se adapten según cada uno de los agro ecosistemas en los cuales han sido colectadas y/o domesticadas. La papa nativa es fruto del proceso de domesticación, selección y conservación realizado por los antiguos habitantes andinos. Las papas nativas deben ser consideradas como un cultivo diferente al de las papas mejoradas, ya que presenta mejor calidad culinaria y alto porcentaje de materia seca. Las papas nativas crecen en los andes, especialmente en Perú y Bolivia, en alturas que fluctúan entre los 3 000 a 4 000 msnm., sus requerimientos de suelos son muy específicos y son más susceptibles a enfermedades como roña, carbón, verruga, rancho y a insectos como la polilla y el gorgojo (Túpac, 2001).

En el departamento de Ayacucho entre los años 1947 a 1997 se registró 421 diferentes variedades de papas cultivadas, registradas en las provincias de Huamanga, Lucanas, Parinacochas, Paucar del Sara Sara, La Mar, Huanta, Víctor Fajardo y Vilcashuamán, siendo las provincias con el mayor número de



variedades registradas: Paucar del Sara Sara con 86 variedades, seguidas de la provincia de La Mar con 78 variedades (Ochoa, 2003).

### 2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

Las papas silvestres y cultivadas están ubicadas dentro de la siguiente posición taxonómica:

Se presenta la siguiente sistemática:

<b>División</b>	: Antophyta
<b>Clase</b>	: Dicotiledoneae
<b>Subclase</b>	: Methachlamydeae
<b>Orden</b>	: Tubiflorales
<b>Familia</b>	: Solanaceae
<b>Género</b>	: Solanum
<b>Especie</b>	: <i>Solanum sp.</i>

Fuente: Mostacero y Mejía, 1993 (tomado de Engler 1892)

### 2.1.2. DIVERSIDAD DE ESPECIE

La papas cultivadas son de diversas especies entre ellas podemos encontrar variedades tetraploides con 48 cromosomas ( $2n=4X=48$ ). Sin embargo, en los andes también se encuentran variedades cultivadas diploides ( $2n=2X=24$ ), triploides ( $2n=3X=36$ ) y pentaploides ( $2n=5X=60$ ). En América Central y América del Sur existen variedades silvestres con 24, 48, 36, 60 y 72 cromosomas. Debido a esta gran variabilidad genética, las papas cultivadas son altamente heterocigotas: el cruzamiento aún dentro de la misma variedad, produce una progenie (hijos) altamente variable. Por esta razón, la pureza varietal solo puede mantenerse por reproducción asexual o vegetativa (Arce, 2002).

Dentro del género *Solanum* el Centro Internacional de la Papa (CIP) hace mención a 8 especies como lo muestra la tabla N° 01.

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

<b>Especies</b>	<b>Subespecies</b>	<b>Ploidía</b>
<i>Solanum tuberosum</i>	Tuberosum	2n=4x=48
	<i>Andigena</i>	
<i>Solanum goniocalyx</i>		2n=2x=24
<i>Solanum stenotomun</i>		2n=2x=24
<i>Solanum chaucha</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.

Actualmente existen en el mundo una gran diversidad de papas nativas, más de 4 000 variedades sembradas en la región andina han sido catalogadas por el CIP, 2 500 de las cuales son cultivares peruanos (Ochoa 2003, Gutiérrez, 2008).

### 2.1.2.1. VARIEDADES SILVESTRES

Existen más de 200 variedades silvestres, el 50% de ellas endémicas en el Perú. Estas se han clasificado en series que llevan características en común y tiene los siguientes nombres: Acaulia, Conicbaccata, Ingafolia, Lignicaulia, Megistacroloba, Olmosiana, Piurana, tuberosa y Yungasensa (CIP, 1999).

Como algunos de los ejemplos del potencial de estas papas silvestres podemos mencionar por ejemplo: la papa silvestre *S. acaule* (2n=4x=48) distribuida por

todo el Perú en las partes altas (punas), es una fuente de extrema resistencia al virus X de la papa, tiene tolerancia heladas y resistente al tizón tardío (ancestro de la variedad perricholi). Otro ejemplo es el de *Solanum berthaultii* ( $2n=2x=24$ ), proveniente de una zona de Tarija, Bolivia. Es resistente al ataque de insectos foliares por poseer tricomas glandulares que actúan de repelente y trampa para los mismos (CIP, 1999).

### 2.1.3. DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

La planta de la papa es una dicotiledónea anual, que pertenece a la familia de las Solanaceas; potencialmente es una planta perenne (Egusquiza, 2000).

#### 2.1.3.1. La hoja

Las hojas son compuestas con 7 a 9 folíolos (imparipinnadas) de forma lanceolada y se disponen en forma espiralada en los tallos. Son bifaciales, ambas epidermis están compuestas por células de paredes sinuosas en vista superficial. Presentan pelos o tricomas en su superficie. Los tricomas pueden ser uniseriados, glandulares y con una cabeza pluricelular más o menos esférica (Egusquiza, 2000).

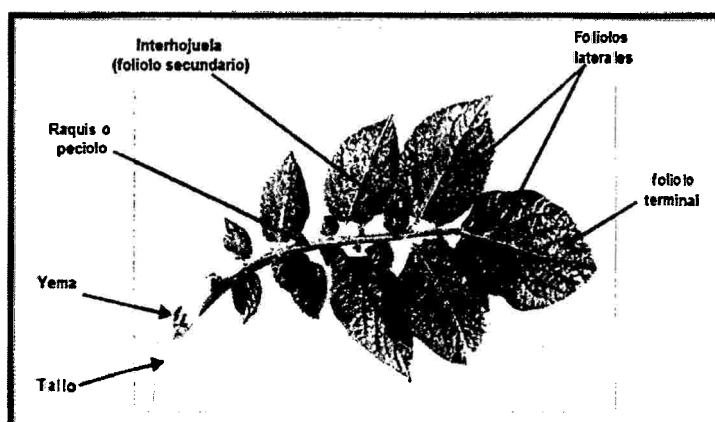
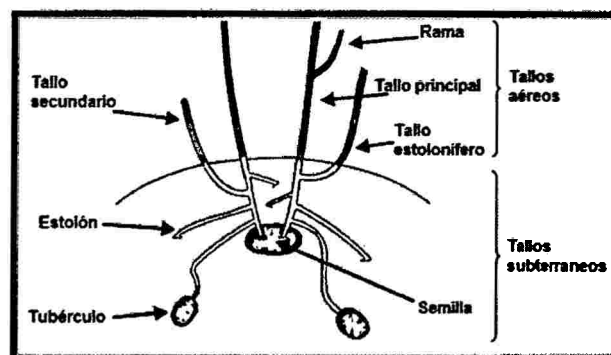


Figura N° 1. Representación de la hoja de la papa con sus respectivos elementos  
Fuente: Egusquiza, 2000.

### 2.1.3.2. El tallo

Los tallos son fuertes y angulosos alcanzando una altura en el momento de máximo desarrollo de entre 0.5 y 1.0 m.

- ❖ Los tallos aéreos normalmente son de color verde ramificado y el corte de la sección transversal es hueco y triangular. La parte más baja del tallo es redonda y sólida. Se considera que un tallo es el tallo principal si crece directamente del tubérculo semilla madre.
- ❖ El tallo principal se origina del tubérculo semilla.
- ❖ El tallo secundario se origina de una yema subterránea del tallo principal.
- ❖ La rama se origina de una yema aérea del tallo principal.
- ❖ El estolón transporta sustancias que se trasladan desde el follaje.
- ❖ El tubérculo es el tallo que almacena sustancias (Egusquiza, 2000).



**Figura Nº 2.** Representación gráfica de un tallo maduro de la papa indicando sus partes  
Fuente: Egusquiza, 2000.

### 2.1.3.3. La flor

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

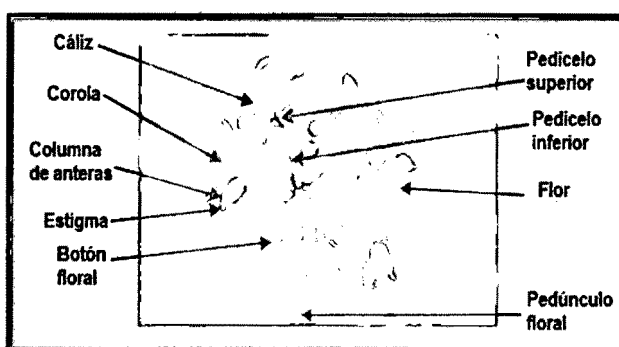


Figura Nº 3. Representación de la flor de la papa indicando sus partes

Fuente: Egusquiza, 2000.

#### 2.1.3.4. El fruto y la semilla

El fruto o baya de la papa se origina por el desarrollo del ovario. La semilla conocida también como semilla sexual, es el ovulo fecundado, desarrollado y maduro. El número de semillas puede variar desde cero (nada) hasta 400. Cada semilla tiene la facultad de originar una planta que, adecuadamente aprovechada, puede producir cosechas satisfactorias (Egusquiza, 2000).

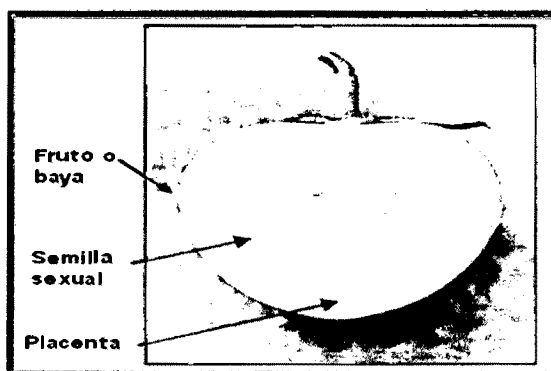


Figura Nº 4. Corte longitudinal del fruto maduro de papa indicando sus partes

Fuente: Egusquiza, 2000.

#### 2.1.3.5. La raíz

Las plantas que se desarrollan a partir de tubérculos, producen raíces adventicias en los nudos de los tallos subterráneos y en los estolones. Sus raíces son muy ramificadas finas y largas (figura Nº 5) dependiendo su desarrollo que el suelo esté más o menos mullido (Egusquiza, 2000). Normalmente, la planta de la papa enraíza bastante cerca de la superficie, no profundizando más

de 40 a 50 centímetros, aunque a veces se han encontrado raíces en suelos muy homogéneos y relativamente sueltos, a una profundidad de hasta 1 metro (Egusquiza, 2000).

Las raíces y estolones se desarrollan a partir del tallo subterráneo, entre el tubérculo semilla y la superficie del suelo, extendiéndose las raíces hacia abajo después de haberse extendido horizontalmente hasta una cierta distancia (Egusquiza, 2000).

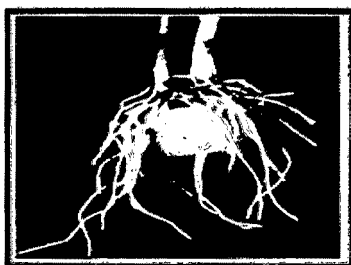


Figura Nº 5. Raíz de una planta madura

Fuente: Egusquiza, 2000.

#### 2.1.3.6. Los tubérculos

Se puede considerar al tubérculo como una parte del tallo que se ha adaptado para almacenar reservas y para la reproducción. A veces se desarrollan tubérculos aéreos en la inserción de las hojas en el tallo; esto ocurre cuando la parte aérea continua produciendo reservas y ha sido bloqueado el transporte de productos de asimilación a los tubérculos, este bloqueo puede estar causado por daños mecánicos o por el ataque de un hongo (por ejemplo: *Rhizoctonia solani*) en la parte más baja del tallo (Egusquiza, 2000).

Los tipos y la cantidad de las sustancias que constituyen el tubérculo son variables y están muy relacionadas con la variedad y las condiciones de crecimiento (Egusquiza, 2000).

Como valores medios de la composición del tubérculo fresco se pueden dar:

- ❖ Agua: 65-85%
- ❖ Hidratos de carbono: 15-28%
- ❖ Proteínas: 1-4%
- ❖ Grasas: 0.05-0.9%
- ❖ Cenizas: 0.5-1.5%.

Otros constituyentes que entran en la composición del tubérculo fresco, lo hacen en menor proporción y son: azúcares, polisacáridos no amiláceos, enzimas, ácido ascórbico, otras vitaminas, sustancias fenólicas, ácidos nucleicos, etc. El tubérculo es muy variado, pero entre sus partes externas es como se muestra en la figura Nº 6 (Egusquiza, 2000).

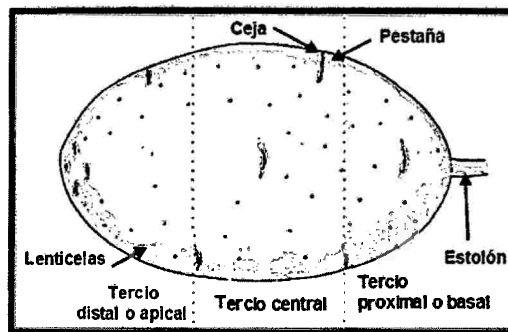


Figura Nº 6. Partes externas del tubérculo.

Fuente: Egusquiza, 2000.

## 2.1.4. TIPOS DE REPRODUCCIÓN

### 2.1.4.1. Reproducción asexual

Por reproducción asexual (también conocida como reproducción vegetativa) o mitosis se obtiene una progenie genéticamente idéntica a su único progenitor. La propagación de la papa mediante tubérculos-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).

La propagación asexual es una ventaja para los mejoradores de la papa porque permite obtener fácilmente un genotipo seleccionado y multiplicarlo. La propagación asexual de la papa permite usar papa aneuploide, con un número de cromosomas que no es múltiplo par del número haploide y del cual se espera poca fertilidad sexual. Por ejemplo, las especies primitivas andinas cultivadas *S. juzepzukii* y *S. chaucha* son triploides ( $2n=3x=36$ ) y tiene una fertilidad baja. Otro uso práctico de la propagación asexual es el cultivo de tejidos una ventaja adicional es la conservación a largo plazo de germoplasma en forma de callos (Estrada, 2000).

Todos los atributos mencionados se logran por medio de la característica principal de la mitosis, esto es, la reproducción de células con una constitución genética idéntica (Estrada, 2000).

#### **2.1.4.2. Reproducción sexual**

- ❖ Comprende dos divisiones nucleares que producen un total de cuatro núcleos o células. Cada uno de los cuatro núcleos o células contiene la mitad del número de cromosomas del núcleo original.
- ❖ Los núcleos o células producidas por meiosis contienen combinaciones completamente nuevas de cromosomas.
- ❖ La reproducción sexual tiene dos etapas: meiosis y fertilización. 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.

A menos que el progenitor sea altamente homocigoto, podemos decir que todo el producto meiótico tiene un genotipo singular. Se espera que de la fertilización o fusión de los gametos masculinos y femeninos, que tiene genotipos singulares,



se obtengan semillas con un genotipo singular. Al mismo tiempo los atributos genéticos buenos de los dos progenitores pueden ser combinados en la semilla (Estrada, 2000).

Entre las aplicaciones de la reproducción sexual está la conservación del germoplasma en forma de semilla sexual (producto de un ciclo de vida sexual). Como el almacenamiento a largo plazo de esta semilla en espacio reducido es fácil, la semilla sexual se usa para conservar germoplasma de papa y para segregar algunas características de las mismas (Estrada, 2000).

#### **2.1.5. ORIGEN Y EVOLUCIÓN LA PAPA**

La papa fue originada y domesticada en la región altiplánica del Lago Titicaca, al sur de Perú por lo menos hace 7 000 años como también tuvo su origen al norte de Bolivia hace quizás unos 10 000 años, desde allí, ella se disperso por la conquista española (Spooner y col., 2005).

Al analizar la composición genética de 365 variedades locales, sus supuestos progenitores y grupos asociados, usando una técnica molecular denominada polimorfismo de la longitud de los fragmentos de la amplificación (AFLP). La evidencia demostró que hubo un punto de origen único de las papas cultivadas al norte del lago Titicaca, en el sur peruano, desafiando de esa manera teorías previas sobre orígenes múltiples (Spooner y col., 2005).

#### **2.1.6. DESCRIPCIÓN AGRONÓMICA**

Gran parte de las papas nativas tiene menor potencial de rendimiento que la papa común. Por otro lado, su calidad es siempre superior, lo que compensa con creces su menor rendimiento, pues su precio es superior y mucho más estable en el mercado (Otazú, 2001).

Las papas nativas se siembran de manera natural entre los 3 400 y 3 800 metros de altitud, con fertilización directa a través de pastoreo y sin agroquímicos. Son plantadas en *shacros*, es decir una mezcla de muchas variedades en un solo campo. De esta manera se aseguran contra eventuales pérdidas, pues el patógeno que ataca una variedad encuentra resistencia en otra. Los suelos son sometidos a períodos de "descanso" de tres a cinco años antes de volverse a plantar (CIP, 2001).

#### **2.1.7. LOS SISTEMAS DE PRODUCCIÓN DE PAPA EN EL PERÚ**

La tecnología empleada en el cultivo de la papa es muy variable, pues en la costa se emplea maquinaria para la preparación de suelos, altos niveles de fertilización química, variedades modernas, alto uso de pesticidas y, en algunos casos, la cosecha es mecanizada. Mientras tanto, en la sierra se presenta una elevada variación en el uso de insumos externos. Es común observar actualmente la preparación de suelos, por los agricultores de las comunidades campesinas, realizada con yuntas de bueyes en las zonas planas y en las zonas de ladera, con herramientas tradicionales como la chaquitacla o arado a pie, que utiliza la fuerza humana (Gómez y Roca, 2008).

#### **2.1.8. ESTADO ACTUAL Y USO DE LAS PAPAS NATIVAS EN EL PERÚ**

Las variedades de papas domesticadas por los antiguos peruanos se denominan papas nativas. Constituye una valiosa herencia de los pueblos pre incaico que durante siglos se desarrollaron. Hoy en día existe en el Perú cerca de tres mil variedades. El uso de la papa nativa es indudablemente la alimentación familiar. Usos secundarios de las papas nativas son: el follaje fresco como forraje; el follaje seco como combustible; las flores para decorar sombreros; las flores y los tubérculos para decoración en ciertas festividades; tubérculos y hojas en usos

medicinales; el líquido de los tubérculos de ciertas variedades amargas para lavar ropa (Gómez y Roca, 2008).

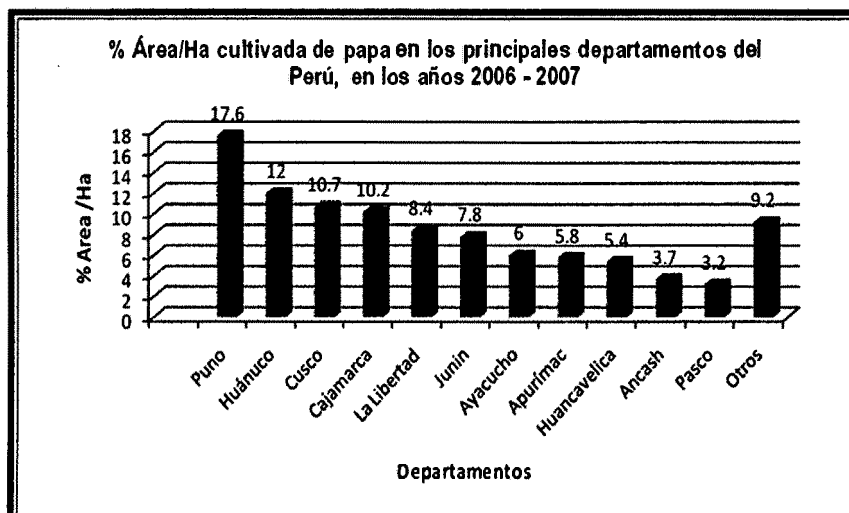


Figura Nº 7. Porcentaje de área cultivada de papa en los principales departamentos del Perú en los años 2006 - 2007  
Fuente: Gómez y Roca, 2008.

## 2.2. DIVERSIDAD GENÉTICA

La diversidad genética se produce en varios niveles de la organización del ecosistema, a través de las especies que lo componen, de sus poblaciones sub específicas (procedencias), grupos de familias y genotipos individuales, hasta el nivel molecular del gen. Si bien la conservación del ecosistema puede también contribuir a lograr la conservación de algunas especies y genotipos incluidos en él, otras podrían perderse, a menos que, por ejemplo, en el caso de árboles maderables importantes, es probable que dentro de estas poblaciones existan una variación sustancial entre arboles individuales (genotipos) (Kemp y col., 1995).

Los rápidos avances en ingeniería genética pueden permitir nuevas combinaciones de características genéticas que podrían transformar las posibilidades de las plantaciones altamente productivas o de cualesquiera otras características deseables, facilitando el mejor uso de las tierras deforestadas o

degradadas. A nivel de genes, las diferencias alélicas podrían ser la base de peculiaridades valiosas, por ejemplo a la resistencia contra plagas o contra la tensión ambiental grave, de gran valor potencial para la adaptación a los cambios medio ambientales y para uso futuro (Kemp y col., 1995).

Por tanto, es esencial que se consideren todos los niveles de diversidad genética y, hasta donde resulte apropiado y practicable, se incluyan en los objetivos y en las actividades de un programa de conservación. Más aún, la organización y la estructura de la diversidad genética en sus distintos niveles constituyen la base tanto del funcionamiento del ecosistema como de los planteamientos para la conservación de los recursos genéticos de las distintas especies (Kemp y col., 1995).

La estructura genética de una especie se define por la forma en que la variación genética se distribuye entre las poblaciones y dentro de ellas. Esta estructura es el resultado de mutaciones, migraciones, selección y flujo de genes entre poblaciones separadas y está fuertemente influida por el sistema genético, que abarca los sistemas de fertilización y de dispersión de polen y semillas (Kemp y col., 1995).

Finalmente la diversidad de genes o diversidad genética se refiere a la variabilidad dentro de una misma especie, es decir, cuanto varían los genes dentro de una especie. Pero también se debe considerar la variedad de genes entre las especies. La diversidad genética se manifiesta en las distintas razas, poblaciones o variedades que conforman una especie, pero también la diversidad de genes que hay entre especies cercanas (Estrella, 2005).

### 2.2.1. EL ORIGEN DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA

Los biólogos evolutivos proponen que los genes estructurales existentes actualmente tuvieron sus comienzos en muy pocos *proto* genes, 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. La duplicación y la modificación génica han desempeñado indudablemente un papel muy importante en la evolución. Es probable que, a medida que se incremente nuestra comprensión acerca de estos procesos, se requerirá inversión de algunos aspectos de la teoría evolutiva (Passarge, 2010).

El polimorfismo genético se refiere a la variación genética observada en las poblaciones. Se distinguen dos tipos de variación: discontinua y continua. Dos o más variantes discontinuas comunes en una población natural se denomina polimorfismo (del griego, muchas formas). Un locus génico se define como polimorfismo si un alelo raro tiene una frecuencia de heterocigotos de al menos 0.01 (1%) o más, lo que se corresponde con una frecuencia de los heterocigotos de 0.02 (2%). Un polimorfismo se considera neutral si la presencia de un cierto alelo no confiere ventaja selectiva, la selección natural se refiere a las diferentes tasas de supervivencia y reproducción. La probabilidad relativa de supervivencia y la tasa de reproducción se denomina aptitud biológica o reproductiva. El polimorfismo puede observarse a nivel de individuo completo (fenotipo), en formas variables de las proteínas y de los grupos sanguíneos (polimorfismo bioquímico) (Passarge, 2010).

### **2.2.2 GENES Y LA IMPORTANCIA DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA**

Desde el punto de vista práctico, el concepto de la diversidad genética interesa sobre todo a la variabilidad de plantas cultivadas y de animales domésticos, pero se aplica también a las plantas y animales no domésticos. La diversidad genética de las plantas es más elevada en las especies polinizadas por el viento (Dajos, 2002).

La importancia de la diversidad a nivel genético (diversidad genética), surge de un hecho muy simple de la vida: todo individuo de una especie que se origina por reproducción sexual tiene una combinación ligeramente distinta de genes. La diversidad genética es la variación genética dentro de los organismos vivos, esto es, las diferencias genéticas entre las poblaciones de la misma especie y entre individuos de dichas poblaciones (Leyle, 1995).

Un aspecto importante de la diversidad genética es que permite a las especies adaptarse con el tiempo a las presiones ambientales que enfrentan. No toda población o individuo tiene el gen o la combinación de los mismos que les permite sobrevivir en el contexto de un ambiente particular. Los seres humanos llevan miles de años utilizando y en algunos casos incrementando la diversidad genética, especialmente en la agricultura. Así como la diversidad genética permite a las especies sobrevivir, los seres humanos, especialmente las comunidades indígenas y locales, se han basado en la diversidad genética para crear un amplio espectro de cultivos, animales y microbianos, genéticamente diversos, que han facilitado su supervivencia. Por estas razones, la efectiva conservación de la diversidad genética debe ir mucho más allá de la simple conservación de especies (Leyle, 1995).

Análisis científicos han demostrado que la gran mayoría de papas nativas poseen mejores características nutricionales que las papas comerciales, que por lo general, reciben una alta dosis de agroquímicos durante su crecimiento. Así, las variedades nativas amarillas tienen un alto contenido de vitamina C; las pigmentadas de rojo o púrpura contienen sustancias como antocianinas y flavonoides, que previenen de enfermedades degenerativas y mientras más oscura sea la pulpa, mayor es la cantidad de antioxidantes que aportan. Además de sus extraordinarias cualidades nutritivas, las papas nativas destacan por su extraordinaria variedad de formas, colores de la cáscara y la pulpa, sabores y texturas. La pulpa de estos tubérculos puede ser blanca, amarilla, roja, naranja o morada y en muchos casos, muestra combinaciones de coloraciones vistosas y únicas (Gutiérrez, 2008).

### **2.2.3. 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 (CIP, 1997).

En esta colección, hay 25 entradas etiquetadas como *Solanum phureja* que según los científicos se asemejan más a otras especies. Por ser una colección pequeña se seleccionó esta especie para probar la efectividad de los marcadores moleculares en un manejo de germoplasma más extensivo, los resultados mostraron que los marcadores identifican una máxima diversidad genética de papas a comparación de los descriptores morfológicos se vienen empleando (CIP, 1997).

#### **2.2.4. POLIMORFISMO DE LAS SECUENCIAS DE ADN**

El análisis de ADN hace posible examinar variaciones de secuencias de ADN entre individuos y especies. Estos estudios pueden realizarse mediante el uso de enzimas de restricción que aporta una visión general a los cambios de pares de bases (Griffiths, 2002).

##### **2.2.4.1. Análisis mediante enzimas de restricción**

Se han identificado numerosas enzimas de restricción, muchas de ellas se usan comúnmente en la tecnología del ADN recombinante, siendo así base fundamental del análisis genómico. Estas son endonucleasas que reconocen secuencias entre 4-8pb en ADN. El sitio de reconocimiento se llama sitio de restricción y la enzima rompe un enlace fosfodiéster en la hebra de arriba y otro enlace fosfodiéster en la hebra complementaria (Fonseca y col., 2010).

El tamaño de los fragmentos de restricción viene determinado por qué tan a menudo una enzima de restricción determinada corte el ADN. Si todos los nucleótidos estuviesen presentes en las mismas proporciones, las enzimas que reconocen una secuencia de 4 nucleótidos, como Alu I (AGCT), harían un corte, en promedio, de cada 256 pares de bases ( $4^n=4^8$ ), produciendo muchos fragmentos pequeños; sin embargo, el tamaño real de los fragmentos producidos al cortar el ADN con una determinada enzima de restricción es variable ya que el número y la localización de las secuencias de reconocimiento no están siempre distribuidas aleatoriamente en el ADN (Fonseca y col., 2010).

#### **2.2.5. ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA DE PAPAS USANDO MARCADORES MOLECULARES AFLP**

Fang y col. (2011), al evaluar la diversidad genética de 64 cultivares de papa resistente a virus (16 fueron de China y 38 provenientes del CIP), empleando



para ello 12 combinaciones de iniciadores AFLP, los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los cultivares tuvieron poca distancia genética muy corta inclusive entre los cultivares de papas propios de China y los provenientes del CIP, en algunos casos los cultivares tuvieron mayor distancia genética, estos resultados de 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 a 0.96.

Akkale y col. (2010), al estudiar la diversidad genética de papas cultivadas en Turquía, empleó seis combinaciones de iniciadores AFLP, obteniendo así 264 bandas de las cuales 191 fueron claramente diferenciadas. El número de bandas polimórficas reportadas estuvieron entre 8 a 45 bandas polimórficas por combinación de iniciador, obteniéndose así una media de 31.5 bandas por iniciador. 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 6 grupos, el contenido de la información polimórfica (PIC) estuvieron de 0.04 a 0.96, con una media de 0.56 por combinación de iniciador.

Nunziata y col. (2010), en el estudio de la diversidad genética de diversas especies de papas provenientes orígenes geográficos diferentes (Perú, Bolivia, México, Estados Unidos, Uruguay, Colombia) empleando marcadores moleculares AFLP y SCAR, encontró coeficientes de similitud genética casi uniformes que van entre el 30 y 50%.

Saeed (2009), al evaluar la diversidad genética de papas de América del Norte y de Europa cultivadas en Iran empleando la técnica molecular AFLP, reportó la accesión de código 676079, con una elevada distancia genética de 0.97 con respecto a los demás grupos, lo cual significa que esta accesión es muy distinta genéticamente a las demás accesiones. Los valores de PIC oscilaron entre 0.48

y 0.723 con una media de 0.606. El rango de la variación de la similitud genética para las demás accesiones varió ligeramente en el rango de 0.697 a 0.881.

Solano y col. (2007), al estudiar la relación existente entre los datos morfológicos y los datos analizados usando marcadores moleculares AFLP en el germoplasma de papas nativas de Chile (22 morfotipos pertenecieron a la especie *Solanum tuberosum* y 1 morfotipo a la especie *Solanum fernandezianum*) obtuvo un bajo nivel correlación entre los caracteres morfológicos y los moleculares ( $r: -0.09$ ).

Kim (1998), en su estudio de la estimación de la diversidad genética de papas cultivadas (*Solanum tuberosum* L.) usando marcadores moleculares AFLP, empleando 7 combinaciones de iniciadores para un total de 12 muestras, obtuvo 409 bandas polimórficas que representa el 88% del total de bandas, el número de bandas polimórficas fueron de 32 a 84 por combinación de iniciador, también en este trabajo el autor resalta que la técnica molecular AFLP puede tener un gran valor en la identificación y medida de la variación genética, pero debe usarse con cautela para estimar medidas reales de similitud genética entre dos genomas.

## **2.3. CARACTERIZACIÓN DEL GENOMA**

### **2.3.1. COLECTA DEL MATERIAL**

Una de las consideraciones más importantes en cualquier procedimiento de extracción de ADN de plantas es la manera utilizada para coleccionar y preservar el tejido vegetal. En la colecta el material debe ser lo más joven posible, no debe maltratarse, cortarse, ni pulverizarse, con ello se evita generar una mayor superficie expuesta al oxígeno y desencadenar procesos oxidativos de

polifenoles (Couch y Fritz, 1997). El material fresco puede ser colectado y mantenido en hielo o en frigorífico durante algunos días hasta ser procesado. Si fuera necesario un almacenamiento prolongado, el material puede ser congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  durante algunas semanas, o  $-80^{\circ}\text{C}$  indefinidamente (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

### 2.3.2. EXTRACCIÓN DE ADN

#### a. Solubilización de membranas

Un procedimiento que presenta algunas modificaciones para resolver problemas específicos de especies con gran contenido de metabolitos secundarios es el método que utiliza un detergente catiónico CTAB (cetyl trimethyl ammonium bomide) de carga positiva, muy adecuado para el aislamiento de ADN de alto peso molecular, el cual se pega fuertemente al ácido nucleico. El CTAB se remueve mediante extracciones con cloroformo y el ADN permanece en fase acuosa listo para ser precipitado con etanol (Valadez y Kahl, 2000).

El CTAB utiliza un sistema Tris-HCl pH 8.0, para mantener el pH constante, este además de solubilizar las membranas lipoproteicas, 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 ésta necesaria para la solubilidad y la acción del CTAB (Dellaporta y col., 1983).

Otro tipo de detergente aniónico es el SDS (Sulfato dodecil de sodio), este tiene la capacidad adicional de desnaturalizar proteínas globulares en su subunidades (Lehninger, 1991); siendo las enzimas la mayor parte de estas proteínas.

También se puede incluir este detergente en el tampón sin excluir el CTAB, ya que pueden usarse en el mismo protocolo (Dellaporta y col., 1983).

#### **b. Inhibición enzimática**

El ADN debe ser protegido de la acción degradativa de las enzimas (nucleasa) o compuestos secundarios liberados con la rotura de la célula.

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 el  $Mg^{2+}$  y  $Ca^{2+}$  (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

La mayor parte de las enzimas quedarán inhibidas bajo condiciones de un pH que no sea el adecuado para las enzimas degradativas como son las DNAsas, que tiene un pH óptimo de 7. El tampón utilizado en la extracción tiene un pH de 8.0 y 9.0 (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

La forma de inhibir las actividades enzimáticas es usando temperaturas no óptimas para la acción de las enzimas eucariotas como la temperatura de incubación de 65°C, que además de facilitar la homogenización permite solubilizar las membranas con el detergente. Otra forma es utilizar un agente reductor como el  $\beta$  mercaptoetanol, que protege al ADN de la peroxidasas y la polifenol oxidasas (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

Se utiliza en algunos protocolos la proteinasa K para inhibir o destruir completamente a las nucleasas, en caso de que se presentara una gran actividad de estas enzimas como se ha reportado para leguminosas (Zhang y Hewit, 1998).

### **c. Complejos de ADN**

El CTAB junto con los iones de Na<sup>+</sup> forma un complejo con el ADN estabilizándolo y protegiéndolo de ataques enzimáticos y/o químicos (Dellaporta y col, 1983).

### **d. Combatiendo los sub productos**

Una concentración elevada de NaCl junto con CTAB permite en el paso inicial la limpieza de los polisacáridos (Cheng y col., 1997).

Un componente importante que se adiciona al tampón de extracción es PVP (polyvinylpyrrolidona), un polímero (Cheng y col., 1997) que tiene efecto antioxidante para reducir el efecto indeseable de la oxidación de los compuestos fenólicos como taninos, quinonas y polifenoles (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El uso de β mercaptoetanol (Cheng y col., 1997), bisulfito/meta bisulfito de sodio (Tanksley, 1989) o L cisteína está sustentado por la acción antioxidante, cuyo uso es obligatorio si se desea restringir la acción de las oxidasas y sus sub productos (polifenoles oxidados) contra el ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Otra estrategia para evitar los problemas que el tejido presenta en la alta formación de polifenoles es la de aislar los núcleos de las células previas a la lisis, mediante soluciones antioxidantes, amortiguar fuertemente la formación de los compuestos problema (Couch y Fritz, 1990).

### **e. Verificación de la calidad y cantidad de ADN**

Para la determinación de la calidad del ADN se precisa la observación de las bandas integras que corresponde a un ADN no degradado y en caso contrario cuando se observa un barrido esta corresponde a un ADN degradado de mala calidad, no apto para la utilización en diversas técnicas moleculares (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La visualización de los fragmentos de ADN se hace directamente en geles 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. El cálculo de la concentración de ADN se realiza mediante la observación de la fotografía del gel en presencia de luz UV o de la imagen digitalizada, cuando es posible el uso de sistemas más sofisticados de integración de datos. Es de extrema importancia evitar la cuantificación por observación directa de las bandas a la luz UV incluso con máscaras de protección (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

Una cuantificación más precisa, se realiza comparando la intensidad de la banda del ADN con la primera banda del marcador de peso molecular conocido (ADN del fago Lambda $\lambda$  cortado con la enzima Pst I), cuyo tamaño es de 14 800pb., su intensidad corresponde a una concentración de 280ng/ $\mu$ L (Ferreyra y Grattapaglia, 1998).

### **2.3.3. ELECTROFORESIS**

La electroforesis es la migración de partículas cargadas a través de un soporte, las cuales están sometidas a un campo eléctrico. Los materiales para la matriz más utilizados en la electroforesis son la poliacrilamida, la agarosa y el almidón. 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 gel de agarosa**

La agarosa es un polisacárido (originalmente obtenido de algas, como el agar-agar, pero de composición homogénea), cuyas disoluciones (típicamente de 0.5 a 2 %) poseen la propiedad de permanecer líquidas por encima de 50° C y formar un gel, semisólido al enfriarse. Este gel está constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas embebida en gran cantidad de medio líquido, que retarda el paso de las moléculas, se emplea usualmente para separar moléculas grandes de alrededor 20 000 nucleótidos (Freifelder, 1991).

#### **b. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

Los geles de poliacrilamida se forman por polimerización de la acrilamida por acción de un agente entrecruzado, es químicamente inerte, de propiedades uniformes, capaz de ser preparado de forma rápida y reproducible. Forma, además, geles transparentes con estabilidad mecánica, insolubles en agua, relativamente no iónicos y que permiten buena visualización de las bandas durante un tiempo prolongado. Además tiene la ventaja de que variando la concentración de polímeros, se puede modificar de manera controlada en el tamaño del poro, lamentablemente cada vez se emplea menos en diagnóstico debido a su neurotoxicidad (Freifelder, 1991).

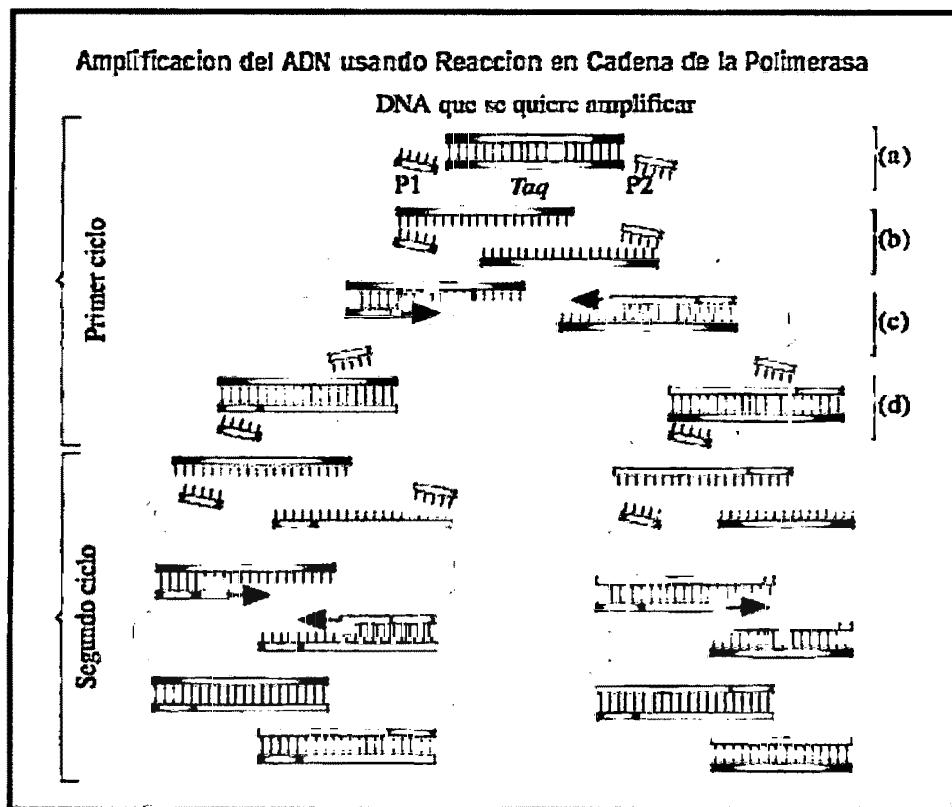
### **2.3.4. REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

En 1983 Kary Mullis de *Cetus Corporation* concibió una nueva técnica que ahora se emplea mucho para amplificar fragmentos específicos de ADN sin la necesidad de células bacterianas. La técnica emplea una polimerasa de ADN termoestable llamada *polimerasa Taq*, que al principio se aisló de *Thermus aquaticus*, una bacteria que vive en manantiales calientes a temperaturas mayores de 90°C. En el protocolo más sencillo, una muestra de ADN se mezcla

con una alícuota de polimerasa Taq y los cuatro desoxirribonucleótidos, junto con un gran exceso de fragmentos sintéticos cortos de ADN (oligonucleótidos) que son complementarios de las secuencias de ADN en los extremos 3' de la región del ADN que va a amplificarse. Los oligonucleótidos sirven como cebadores a los que se agregan los nucleótidos durante los pasos siguientes de replicación. Luego la mezcla se calienta a unos 93°C, que es lo bastante caliente para hacer que las moléculas de ADN de la muestra se separen en sus dos cadenas componentes (Karp, 2006).

A continuación la mezcla se enfría a unos 60°C para permitir que los cebadores se unan con las cadenas de ADN y la temperatura se eleva de nuevo a 72°C para que la polimerasa termofílica agregue nucleótidos al extremo 3' de los cebadores. Conforme la polimerasa extiende el cebador, copia de manera selectiva el ADN blanco y forma nuevas cadenas de ADN complementario. La temperatura se eleva de nuevo, lo que hace que las cadenas de ADN recién formadas y las originales se separen. En seguida se enfría la muestra para permitir que los cebadores sintéticos de la muestra se unan de nuevo con el ADN blanco, que ahora está presente en una cantidad dos veces mayor que la original. Este ciclo se repite una y otra vez, y en cada ronda se duplica la cantidad de la región específica del ADN que está flanqueado por los cebadores unidos (Karp, 2006).





**Figura Nº 8.** Pasos de la Reacción en Cadena de la Polimerasa

Fuente: Gonzales, 2010.

- ❖ La mezcla de reacción contiene la secuencia de DNA que se quiere amplificar, dos oligonucleótidos sintéticos (P1 y P2) que servirán como cebadores o iniciadores, una DNA polimerasa termoestable (Taq) y los cuatro desoxirribonucleótidos trifosfato dATP, dGTP, dCTP y dTTP.
- ❖ La mezcla de reacción se somete a ciclos sucesivos, cada uno correspondiente a una fase de desnaturalización, una de hibridación y una de elongación. Durante la desnaturalización, que se realiza por calentamiento de la mezcla a 95 °C, se separan las dos cadenas del DNA molde.
- ❖ Durante la hibridación, la temperatura de incubación se reduce para permitir el apareamiento de las bases de ambos cebadores en el sitio donde encuentran una secuencia complementaria.

- ❖ Durante la fase de elongación, la mezcla se calienta a 72°C, temperatura a la cual la DNA polimerasa extiende la cadena complementaria a partir del extremo 3' de los cebadores. Al finalizar cada ciclo, la cantidad de DNA molde disponible para el ciclo siguiente aumenta al doble (Gonzales, 2010).

### **2.3.5. MARCADORES MOLECULARES**

Un marcador molecular es un sitio en el que hay heterocigosis para algún tipo de variación neutra en el ADN; esto es, que no está asociada a ninguna variación fenotípica observable (Griffiths y col., 2002).

Se consideran bajo la denominación de marcadores moleculares a 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 (Cubero, 2003). Las ventajas que contienen estos marcadores sobre los demás son:

- ❖ Se puede detectar pequeñas variaciones con mínimas cantidades de material.
- ❖ No afecta al fenotipo: son totalmente neutros (ventajas que tienen casi todas las isoenzimas).
- ❖ Pueden detectarse en cualquier estado del desarrollo, incluyendo el mismo embrión.
- ❖ Se distribuye a lo largo de todo el genoma. Esta característica es muy importante para facilitar la construcción de mapas.
- ❖ Muchos de estos marcadores, aunque no todos son codominantes.
- ❖ No muestra epistasia ni pleiotropía.
- ❖ El número de variaciones (polimorfismos) a que dan lugar es enorme (Cubero, 2003).

### **2.3.5.1. Análisis de la diversidad genética empleando el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)**

Esta técnica fue desarrollada en 1993 por la compañía privada Keygen, poseedora de la patente (Vos, 1995). Este nuevo marcador molecular detecta presencia o ausencia de los fragmentos de restricción más que diferencias de longitud. A pesar de esto, es muy frecuente encontrarlo citado de esta forma (González y Pita, 2001).

Los AFLP se han convertido en los más usados para estudios moleculares debido a las ventajas que se presentan (Sevilla y Holle, 2004). Esta técnica en esencia de cuatro etapas:

#### **a. Digestión del ADN**

El ADN es digerido con dos enzimas de restricción diferentes, una de corte raro, cuyo sitio de restricción tiene 6 nucleótidos, por ejemplo Eco RI (G/AATTC) y la otra de corte frecuente, con un sitio de restricción de 4 nucleótidos, MseI (T/TAA) (Vos y col., 1995). El corte frecuente sirve para generar fragmentos pequeños (MseI/MseI) producidos por el corte del enzima de MseI, los cuales amplifican bien y tiene el rango de óptimo de tamaño para la separación en gel de poliacrilamida o de secuenciamiento, como también el corte raro es el que limita el número de fragmentos que son amplificados. Empleando 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 unen 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).

## **b. Ligación de adaptadores**

Adaptadores de ADN de doble cadena se adhieren de forma específica a los extremos de los fragmentos digeridos, proporcionando secuencias conocidas, generando así el molde para la amplificación de ADN (Picea, 2004). Los adaptadores son específicos para cada sitio de restricción de Eco RI o MseI.

El uso de adaptadores es necesario porque las secuencias que quedan en los bordes de los fragmentos, luego que son cortados, no son adecuadas, para actuar como iniciadores (Karp, 1998), sin la presencia de estos, la propia secuencia de corte no proporciona información adecuada para el diseño de iniciadores (Vos y col., 1995).

## **c. Selección de combinación de iniciadores**

La elección del número, la secuencia así como la combinación de iniciadores que son usados en la amplificación selectiva es un paso importante del proceso de AFLP, ya que determinará el nivel de polimorfismo accesible en este estudio. Un buen iniciador debe discriminar individuos procedentes de diferentes poblaciones; pero también ser lo suficientemente polimórficos en individuos de una misma población, lo cual permite identificar casos de sinonimia, identificando precisamente los clones (Von, 2003).

## **d. Amplificación de los fragmentos**

En este paso se realizan dos tipos de amplificación.

### **d.1. Amplificación pre selectiva o pre amplificación de los fragmentos digeridos**

Se usan iniciadores donde el extremo 3' contiene un nucleótido al azar que es una base selectiva (Eco + A y Mse + C) complementaria a la secuencia del

fragmento. Con la base selectiva se consigue la reducción del número de fragmentos a analizar (Vos y col., 1995).

El iniciador es una secuencia complementaria a la secuencia del adaptador. El producto de esta amplificación es diluido y sirve como molde para una segunda amplificación (Picca, 2004).

Los productos de los pasos digestión/ligación y pre amplificación pueden ser corridos y visualizados en geles de agarosa al 1.6% la digestión debe dar un barrido lo que indica que las otras reacciones previas están correctamente realizada y es seguro de seguir con la amplificación siguiente (Picca, 2004).

#### **d.2. Amplificación selectiva de los fragmentos del producto de la amplificación pre 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 un solo grupo de fragmentos de restricción (aquellos en que coinciden las secuencias del adaptador + sitios de restricción+ bases selectivas) (Picca, 2004).

Aquí se pueden usar diferentes combinaciones de iniciadores con tres bases selectivas, en este paso los iniciadores pueden ser marcados con  $^{33}\text{P}$  o  $^{32}\text{P}$  (método radiactivo), con productos fluorescentes (método de fluorescencia) o simplemente no ser marcados (método de tinción con nitrato de plata) (Picca, 2004).

#### **e. Detección de fragmentos AFLP**

El análisis de fragmentos amplificados mediante su desnaturalización por electroforesis en geles de poliacrilamida de tipo desnaturalizante (de alta resolución) y de resolución por autorradiografía o por tinción con nitrato de plata este proceso de tinción en pocos pasos pero de suma importancia su correcta

aplicación y adaptación a las condiciones del laboratorio estos pasos a saber son básicamente: Fijación, tinción y revelado (Karp, 1998).

## **2.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS**

### **2.4.1. 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, 1963, Crisce y Lopez, 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).

### **2.4.2. UNIDAD TAXONÓMICA OPERATIVA (OTU)**

Las siglas OTU son las siglas de Operacional Taxonomic 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 de determinar la existencia de duplicados, homónimos o sinónimos, cada una de las accesiones será una OTU si por el contrario lo que se quiere analizar es la variedad intra poblacional, la OTU sería el individuo (Gonzales y Pita, 2001).

### **2.4.3. 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).

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 (Sevilla y Holle, 2004).

En el caso del uso de marcadores moleculares del tipo AFLP los caracteres son tomados de la lectura de la presencia o ausencia de bandas (sistema binario) que son registradas en una matriz para ser analizados con programas estadísticos (Sevilla y Holle, 2004).

La clasificación biológica es más real, 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 mas 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 (Sevilla y Holle, 2004).

#### **2.4.3.1. 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 (Sneath y Sokal, 1973).

El número de 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).

#### **2.4.3.2. 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/o estados y se obtienen por la observación (Kneller, 1978).

Para tratar estadísticamente los resultados de un estudio de caracterización molecular, los caracteres deben ser correctamente codificados desde el punto de vista numérico (Sneath y Sokal, 1963).

**Tabla Nº 2.** Tipos de datos para la codificación de caracteres

<b>TIPO DE DATOS</b>		
<b>Datos doble estado</b>	Presencia – ausencia	
	Estados excluyentes	
<b>Datos multiestado</b>	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 dos estados. Pueden indicar presencia/ausencia y estados excluyentes.

**Tabla Nº 03.** Tipo de datos doble estado

<b>Carácter</b>	<b>Estado</b>	<b>Codificación</b>
	Presencia	1
	Ausencia	0

Fuente: Alagón y Rosas, 2008



#### **2.4.4. 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).

#### **2.4.5. 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.

##### **a. 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) (Sevilla y Holle, 2004).

##### **b. 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<sub>j</sub> y OTU<sub>k</sub>. los coeficientes de correlación son funciones de esos ángulos (Sevilla y Holle, 2004).

##### **c. 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 OTUj y OTUk, se presentan cuatro posibilidades que se observan a continuación.

**Tabla Nº 4.** Matriz (2x2) que muestra las combinaciones posibles al compararse dos OTUs (j y k) para un carácter de tipo doble estado.

		<b>OTUk</b>			
		<b>Presente(1)</b>	1	0	A+b
<b>OTUj</b>			1,1	1,0	
	<b>Ausente (0)</b>		0,1	0,0	C+d
			a+c	b+d	
Donde: $m=a+b+c+d$					

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

Donde:

1,1(a): Representa que ambos OTUs tienen el carácter comparado

1,0(b): Es el carácter que presente en el primer OTU y ausente en el segundo.

0,1(c): Representa el carácter ausente en el primer OTU y presente en el segundo OTU.

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 las OTUs (Sevilla y Holle, 2004).

## 2.4.6. 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 multi-estado y los coeficientes de asociación y de distancia se utilizan para los datos doble estado.

Según Rohlf, 1997, entre los coeficientes de asociación se encuentran: Coeficiente de Roger y Tanimoto, Sokal y Sneath, Hannan, Yule, Coeficiente ( $\phi$ ) de Pearson, Rossel y Rao, Kulczynski, Ochiai. Entre los coeficientes 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 Sokal y Michener o Coeficiente de concordancia simple "Simple Matching" (SM).

### a. Coeficiente de similitud de dice y sorensen

$$S_D = 2a / 2a + b + c = A / (a+b) + (a+c) / 2$$

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.

### b. Coeficiente de similitud de jaccard (sneath)

$$S_J = A / a + b + c + d$$

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.

**c. Coeficiente de similitud de Simple Matching:**

$$S_{SM} = a+b / a+b+c+d$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

Simplemente es la proporción de caracteres que comparten las dos muestras (Winzer y col., 2004).

Para considerar algunos criterios en la selección de los coeficientes de similitud se tienen que tener en cuenta la concepción del mismo. Dos muestras se consideran más asociadas cuando comparten tantos “unos” como “ceros” (Winzer y col., 2004).

#### **2.4.7. 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 OTUs (González y Pita, 2001).

#### **2.4.8. ANÁLISIS DE AGRUPAMIENTOS**

El análisis de agrupamientos 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: Sequential, Agglomerative, Hierchical y Nested El significado de estos términos traducidos es como sigue:

**a. técnicas exclusivas**

Originan grupos donde los OTUs son exclusivas del grupo del cual forman parte y no pueden pertenecer a otro grupo que se halle en un mismo rango o nivel.

**b. Técnicas jerárquicas**

Originan conjuntos que presentan rangos, en los cuales las OTUs o grupos de OTUs subsidiarios forman parte de un grupo mayor o exclusivo.

**c. 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.

**d. Técnicas secuenciales:**

Se forma un grupo de cada vez, hasta que se agota el conjunto total.

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

- ❖ 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).
- ❖ Se busca el próximo valor de mayor similitud, lo que puede suponer la formación de nuevos núcleos, incorporación de nueva OTU a un núcleo, con lo que se originaría un grupo (conjunto formado por más de dos OTU), fusión de núcleos existentes.
- ❖ 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 "Unweighed Pair – Group Method Using Arithmetic Averages" o media aritmética 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).

#### **2.4.9. DENDOGRAMA**

La estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamientos puede representarse gráficamente de varias formas, pero la más utilizada es el dendograma (Crisci y López, 1983).

El dendograma es un diagrama arborescente que muestra la relación en grado de similitud entre dos o más OTUs (Crisci y López, 1983).

##### **2.4.9.1. Coeficiente de correlación cofenético ( $r$ )**

Si se examina con atención las técnicas de construcción de un dendograma, se comprobara 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 (Rohlf, 1970).

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

### 2.5.0. ANÁLISIS DE CONTENIDO DE ÍNDICE POLIMORFICO (PIC)

Si los valores de PIC de cada marcador son sumados entonces se podrán tener un índice de iniciador de AFLP (Senior, 1998; Ghislain, 1999). 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 (Botsein, 1980).

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

**Donde:**

$f_i$  : Es la frecuencia del  $i$ -ésimo alelo

$p$  : Frecuencia de las bandas presentes

$q$  : Frecuencia de las bandas ausentes

**2.5.1. 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 versión 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.



## **CAPÍTULO III.**

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. LUGAR DE EJECUCIÓN**

La primera fase de este trabajo ha sido la recolección en campo de los morfotipos de papas nativas para luego proseguir a su posterior siembra en vivero permitiendo así obtener plantas jóvenes para la introducción y micropropagación *in vitro* que permitió la extracción de ADN de buena calidad, estas etapas se desarrolló en el Laboratorio de Biología Molecular de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. El análisis molecular del ADN obtenido se realizó por la técnica AFLP ejecutada en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Investigación e Innovación Agraria (INIA- Lima).

#### **3.2. MATERIAL BIOLÓGICO**

El material vegetal utilizado proviene de la localidad de Sillaccasa - Unión Libertad (13°10'50,36" S 73°38'18.47" O) del distrito de Chungui de la provincia La Mar del Departamento de Ayacucho, que fueron colectados en el mes de Junio del 2009.

En total se analizaron 25 morfotipos de papas nativas que fueron seleccionadas y proveídos por los mismos productores agrarios. Los datos pasaportes de los morfotipos de papas nativas son reportados en la tabla N° 11 del anexo.

### **3.3. MATERIALES DE LABORATORIO**

#### **3.3.1. MATERIALES PARA LA COLECTA**

- ❖ Bolsas plásticas
- ❖ Guantes de goma desechables
- ❖ Papel toalla
- ❖ Cintas para rótulos
- ❖ Bisturís
- ❖ Placas petri
- ❖ Plumones marcadores de vidrio.

#### **3.3.2. MATERIALES PARA LA EXTRACCIÓN DE ADN**

##### **a. Reactivos químicos**

- ❖ Ácido acético glacial
- ❖ Agua destilada
- ❖ Alcohol isoamílico
- ❖ Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB)
- ❖  $\beta$  Mercaptoetanol
- ❖ Cloroformo
- ❖ Cloruro de sodio
- ❖ Ácido etilen diámetro tetra acético (EDTA)
- ❖ Etanol absoluto
- ❖ Isopropanol
- ❖ ARNasa

- ❖ Sodium dodecil sulfate (SDS)
- ❖ Polyvinilpyrrolidone (PVP)
- ❖ Hidroxymethyl amonio etan (Tris).

**b. Materiales de Laboratorio**

- ❖ Agitadores magnéticos
- ❖ Espátulas, pinzas, tijeras
- ❖ Placas petri
- ❖ Guantes de Latex
- ❖ Juego completo de pipetores
- ❖ Magnetos
- ❖ Vaso de precipitados
- ❖ Morteros de porcelana con su respectivo pistilo
- ❖ Puntas plásticas de 10, 200, 1000 $\mu$ L de capacidad,
- ❖ Probetas de 10, 100, 1000mL
- ❖ Racks de polipropileno
- ❖ Tubos para microcentrífuga (Eppendorf) de 0.6, 1.7 y 2.0 ml
- ❖ Autoclave
- ❖ Balanza analítica
- ❖ Bomba de vacio
- ❖ Cámara de baño maría
- ❖ Campana extractora de gases
- ❖ Congeladora a -20oC
- ❖ Estufa
- ❖ Horno microondas
- ❖ Refrigeradora
- ❖ Vortex.

### **3.3.3. MATERIALES PARA ELECTROFORESIS (HORIZONTAL Y VERTICAL)**

#### **a. Reactivos químicos**

- ❖ **Ácido acético glacial, (Merck)**
- ❖ **Acrilamida**
- ❖ **Agarosa**
- ❖ **Agua destilada**
- ❖ **Azul de bromofenol, (Sigma)**
- ❖ **Repelente de agua**
- ❖ **Bind silano Adherente, (Merck)**
- ❖ **Bromuro de Etidio (Sigma)**
- ❖ **Bisacrilamida (N, N' – Methylene – bis acrylamide), (Sigma)**
- ❖ **Hidróxido de sodio, (Merck)**
- ❖ **Formaldehido al 37%, (Merck)**
- ❖ **Marcador de peso molecular, (Gen Ruler TM 10pb DNA ladder, )**
- ❖ **Marcador de peso molecular, ADN del fago Lambda**
- ❖ **Persulfato de amonio,(Sigma)**
- ❖ **TEMED (n,n,n'n' – Tetra – metil etilen di amina), (Merck)**
- ❖ **Formaldehido al 37%**
- ❖ **Tiosulfato de sodio, (Merck)**
- ❖ **Úrea, (Merck)**
- ❖ **Xilen xianol, (Sigma).**

#### **b. Material de laboratorio**

- ❖ **Cajas de dilución de 96 pocillos, 1 ml de capacidad c/u, (Axigen científico)**
- ❖ **Gradillas para microtubos**
- ❖ **Placas de vidrio para electroforesis vertical**
- ❖ **Papel tisissue, (Kimwipe)**
- ❖ **Rack polyproyle, (Axygen)**

- ❖ Vasos de precipitados de 50 y 100 mL.

**c. Equipos**

- ❖ Fotodocumentador (BIO - RAD)
- ❖ Cámara de electroforesis horizontal, (BIO - RAD)
- ❖ Cámara de electroforesis vertical, (BIO - RAD)
- ❖ Cámara digital
- ❖ Expositor de Luz UV transiluminador , (BIO - RAD)
- ❖ Escáner, (Epson)
- ❖ Horno microondas (Samsung)
- ❖ Impresora laser, (Xerox Phaser 3120)
- ❖ Purificador de agua, (Milipore)
- ❖ Refrigeradora, (Electrolux)
- ❖ Shaker, (New Brunswick Scientific)
- ❖ Bomba de vacío.

**3.3.4. MATERIALES PARA LA DIGESTIÓN, LIGACIÓN Y PCR**

**a. Reactivos Químicos para la digestión**

- ❖ Buffer de restricción 5X
- ❖ MseI 5U/ $\mu$ L (Invitro gen)
- ❖ Eco R I 10U/ $\mu$ L (Fermentas)

**b. Reactivos Químicos para la ligación de adaptadores**

- ❖ Buffer T4 ligasa 5X (Invitrogen)
- ❖ Adaptador Mse (Invitrogen)
- ❖ Adaptador Eco (Invitrogen)
- ❖ T4 ADN ligasa 5U/ $\mu$ L (Invitrogen).

**b. Reactivos químicos para PCR**

- ❖ Cloruro de magnesio 25mM (Promega)

- ❖ Desoxinucleótidos, (dATP, dGTP, dCTP, dTTP) (Promega)
- ❖ Enzima taq polimerasa
- ❖ Buffer 10X PCR.

**c. Materiales de laboratorio**

- ❖ Micropipetas regulables de 0.5-10 $\mu$ l, 5-20 $\mu$ l (uso exclusivo para PCR), (BIO-RAD)
- ❖ Placas de policarbonato PCR de 96 pocillos, (Axygen)
- ❖ Puntas para micropipeta 0.5-10 $\mu$ l, 5-20 $\mu$ l, (Axygen)
- ❖ Tubos en tiras y tapas en tiras para PCR, (Axygen)

**d. Equipos**

- ❖ Microcentrífuga para tubos de 1.7ml, de un máximo de hasta 10000rpm, (BIO-RAD)
- ❖ Termociclador, (Eppendorf).

**3.3.5. Software para el análisis estadístico**

- ❖ NTSYS– pc version 2.10p (Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, EE.UU).

### **3.4. METODOLOGÍA**

#### **3.4.1. COLECTA DE LAS MUESTRAS**

El material vegetal consistió de tubérculos de papas nativas que fueron colectados en el mes de junio del 2009 en la localidad de Unión Libertad del distrito de Chungui (3290 a 3868 msnm), provincia La Mar del departamento de Ayacucho, las cuales fueron identificadas y seleccionadas por los mismos comuneros.

Los morfotipos en mención fueron sembrados en condiciones de invernadero en sustrato conteniendo tierra agrícola, tierra negra y arena en proporción de 3:2:1 respectivamente. Se esperó los primeros brotes de la planta para la introducción y micropropagación en condiciones *in vitro* (figura N° 14), usando para ello el medio de cultivo Murashigue Skoog (1962).

#### **3.4.2. EXTRACCIÓN DE ADN**

La extracción de ADN se realizó empleando el método CTAB (CIP, 1997) modificado (Protocolo N°1), para lo cual se tomaron las hojas y tallos de las plántulas jóvenes 4 a 6 semanas del cultivo *in vitro*.

#### **3.4.3. DETERMINACIÓN DE LA CALIDAD Y CONCENTRACIÓN DE ADN**

La calidad y la cantidad de ADN fue verificada por el método de electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), para la carga de las muestras al gel de agarosa se empleó 1µL de ADN genómico el cual fue diluido con 9µL del colorante de carga SALB 1X (Protocolo N° 02). Como tampón de corrida se utilizó TBE 1X obtenidos de la dilución del TBE 10X (Protocolo N° 02). Para el cálculo de la concentración de ADN de las muestras se comparó con la intensidad de la primera banda del estándar del ADN Lambda ( $\lambda$ ) digerida con la endonucleasa de restricción Pst I.

la cual corresponde a una concentración de 280ng/μl. como muestra la Figura N° 15 del anexo.

La determinación de la calidad del ADN se definió por observación visual, identificando que las bandas sean claras, bien definidas y que la corrida electroforética no presente ningún barrido o bandas poco definidas, que significaría que la muestra de ADN estaría presentado indicios de degradación.

La calidad del ADN es un factor crítico en la obtención de marcadores AFLP confiables, debiendo ser este de buena calidad, sin contaminantes, ni inhibidores, mucho menos degradado.

#### **3.4.4. TÉCNICA DE AFLP**

Antes de empezar la técnica de AFLP con todos los morfotipos, se realizó una prueba con muestras de ADN de 4 morfotipos de papas nativas lo cual permitió evaluar las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica.

La técnica AFLP usada en la detección de marcadores se realizó según el protocolo de biología molecular del Centro Internacional de la Papa (CIP), esta metodología consistió de 4 etapas importantes: digestión, ligación, pre amplificación y amplificación selectiva. En la presente investigación se realizaron algunas modificaciones tanto al método de extracción de ADN genómico como al de la técnica de AFLP que es como se detalla en los protocolos del anexo.

##### **3.4.4.1. Digestión del ADN genómico**

Para la digestión se preparó una mezcla conteniendo ADN genómico, agua libre de nucleasas, buffer de reacción 10X, enzimas de restricción EcoRI que reconoce 6pb y la endonucleasa MseI que reconoce 4pb (Protocolo N° 3).



La mezcla de reacción se incubó a 37°C toda la noche para asegurar una digestión completa, transcurrido este tiempo la reacción fue detenida llevando el producto de la digestión a -20°C para su conservación y posterior empleo.

#### **3.4.4.2. Ligación de adaptadores**

Al producto de la digestión anterior se agregó los componentes del master mix (MMx) con los adaptadores preparados (Protocolo N° 04) para llevar a cabo la reacción de ligación de adaptadores complementarios a los extremos de los fragmentos generados (Protocolo N° 05). Para este proceso se preparó una solución conteniendo ADN digerido (20µL) con 2U de T4 ADN ligasa (in vitrogen) en buffer de reacción, adaptador MseI, adaptador EcoRI y agua milli Q libre de nucleasas, posteriormente la solución se incubó a temperatura ambiente (20°C) toda la noche.

#### **3.4.4.3. Reacción de pre amplificación (00/00)**

Se preparó el MMx en los tubos eppendorf de 0.2mL, bajo condiciones de estricta limpieza con los componentes mencionados en el Protocolo N° 06, El programa en el termociclador fue como muestra la tabla N° 6, lo cual permitió amplificar las secuencias ligadas a los adaptadores. Para la verificación del proceso se tomó 4µL del producto de la pre amplificación y se cargó con 6µL del colorante de carga SALB 1X en geles agarosa al 1% (p/v), se corrió la electroforesis a 80 voltios por espacio de 15 a 20 minutos.

**Tabla N° 6.** Programa de pre amplificación en el termociclador

<b>T(°C)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>Ciclos</b>
72	2 Min.	1
94	4 Min.	1
94	30 Seg.	
56	60 Seg.	22
72	60 Seg.	
72	5 Min.	1
4	∞	Fin del programa

#### **3.4.4.4. Amplificación selectiva (+3/+3)**

Para este paso se emplearon combinaciones de iniciadores específicos los cuales contenían 3 nucleótidos adicionales en sus extremos 3' (Protocolo N° 07) que permitió la amplificación selectiva del grupo de fragmentos que contenían los nucleótidos complementarios a la secuencia de iniciadores nuevos.

Se preparó el MMx (Protocolo N° 07). La reacción se realizó sobre hielo para asegurar la estabilidad de sus componentes. Se escogió la opción tapa caliente en el termociclador, la verificación del producto de la amplificación selectiva se realizó por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v), a 80 voltios durante 15 a 20 minutos, para ello se tomó 4µL del producto de la amplificación selectiva con 6 µL del colorante SALB1X.

#### **PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR:**

1. 94°C x 4min
2. 94°C x 20s
3. 65°C x 30s
4. 72°C x 2 min

5. 94°C x20s
6. 65°C X 30s bajando 1°C por ciclo
7. 72°C 2 min
8. Repetir desde el paso 5 al 7 --- 10 ciclos
9. 94°C x20s
10. 56°C 30 s
11. 72°C 2 min
12. Repetir desde el paso 9 al 11 --- 20 ciclos
13. 60°Cx 30 min
14. 4°C x ∞.

#### **3.4.4.5. Electroforesis en gel de poliacrilamida**

El análisis del producto de la amplificación selectiva se realizó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% en cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD), siguiendo el protocolo Protocolo N° 08 del anexo.

Los geles de la electroforesis tuvieron que ser teñidos y revelados inmediatamente Sanguinetti (1994).

#### **3.4.4.6. Tinción y revelado de geles de poliacrilamida**

La visualización del producto del AFLP fue mediante una correcta tinción con nitrato de plata de los geles de poliacrilamida como muestra el protocolo N° 08 del anexo.

#### **2.4.4.7. Escaneo y lectura de bandas amplificadas**

La lectura se realizó mediante la observación directa de los geles de poliacrilamida en el trans iluminador de luz blanca, se inició con la lectura desde el primer individuo, la lectura fue realizada en el rango de 100 a 240pb rango en el cual las bandas aparecieron claramente distinguibles. Una vez hecha la

lectura de las bandas, cada gel fue escaneado para tener un registro de su patrón de bandas.

### 3.4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

#### 3.4.5.1. REGISTRO DE DATOS

Se creó un registro de datos binarios de la lectura, en los que cada banda de ADN se consideró como un locus individual con dos posibles alelos: presencia "1" y la ausencia como "0". Mientras que a las bandas de presencia dudosa se le asignó el valor de 9.

Se asume que el patrón de bandas muestra dominancia, la presencia de banda nos indica que puede ser un genotipo del tipo homocigótico dominante o un heterocigótico. Los datos fueron ingresados en la hoja de cálculo de Microsoft Excel 2003 donde las columnas corresponden a los nombres de los morfotipos de papas nativas y las filas corresponden a las bandas (marcadores AFLP).

#### 3.4.5.2. Determinación del índice de contenido polimórfico (PIC)

Como primer paso se calcularon las frecuencias de las bandas presentes y ausentes, con estos datos se procedió a calcular los valores de PIC para cada combinación de iniciadores.

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

**Donde:**

$f_i$  : Es la frecuencia del i-ésimo alelo

$p$  : Frecuencia de las bandas presentes

$q$  : Frecuencia de las bandas ausentes.

**Tabla Nº 07.** Procedimiento para el cálculo de los índices de contenido polimórficos (PIC)

### ÍNDICE DEL CONTENIDO POLIMÓRFICO

Fragmento Polimórfico	PIC/LOCUS	$=1-f_{(1)}^2 - f_{(2)}^2$
A1		PIC a1
A2		PICa2
A3		PICa3
.		.
.		.
.		.
ax		PIC ax

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

❖ El cálculo del PIC AFLP para cada combinación de iniciadores usados fue mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Índice} = \sum (\text{PIC}_{a1} + \text{PIC}_{a2} + \dots + \text{PIC}_{ax}) / L$$

Fuente: Alagón y Rosas, 2008.

**Donde:**

$a_1, a_2, \dots, a_x$  : Fragmentos polimórficos

$L$  : Número total de fragmentos polimórficos por cada combinación de iniciadores.

#### 3.4.5.3. Análisis de similaridad

Se ingresaron los datos obtenidos de la lectura de las bandas a una matriz binomial que fue usada para calcular valores de similitud genética entre cada par

de genotipo usando el coeficiente Simple Matching. Incluidos en el paquete estadístico NTSYS – pc versión 2.10p (Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, EE.UU).

#### **3.4.5.4. Análisis de agrupamientos**

Con la matriz de similitud que fue obtenida del análisis de similaridad con el empleo del coeficiente Simple Matching, con lo que se obtuvo el dendograma (figura Nº 12), que se realizaron según el algoritmo de UPGMA (Unweigthed Pair-Group Method using Arithmetic Averages), dentro del módulo SAHN del programa.

## **CAPÍTULO IV.**

### **RESULTADOS**

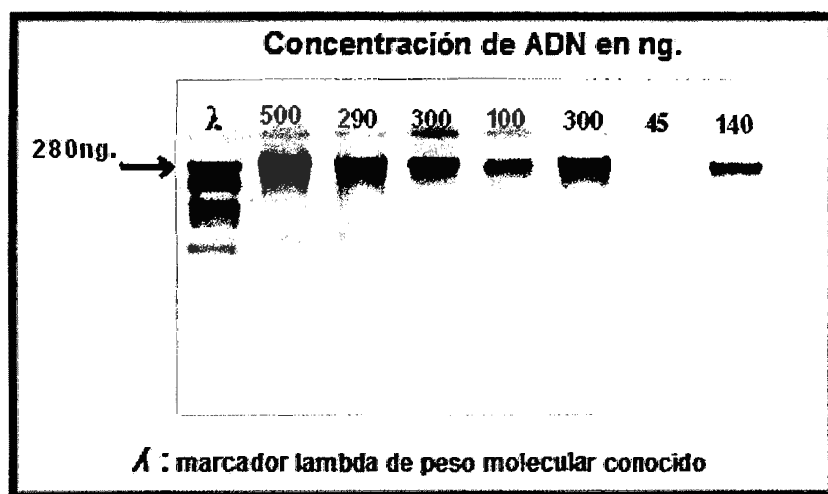


Figura Nº 9. Calidad y cantidad de ADN extraído de los morfotipos de papas nativas del distrito de Chungui, Laboratorio de Biología Molecular del INIA – Lima, 2010.



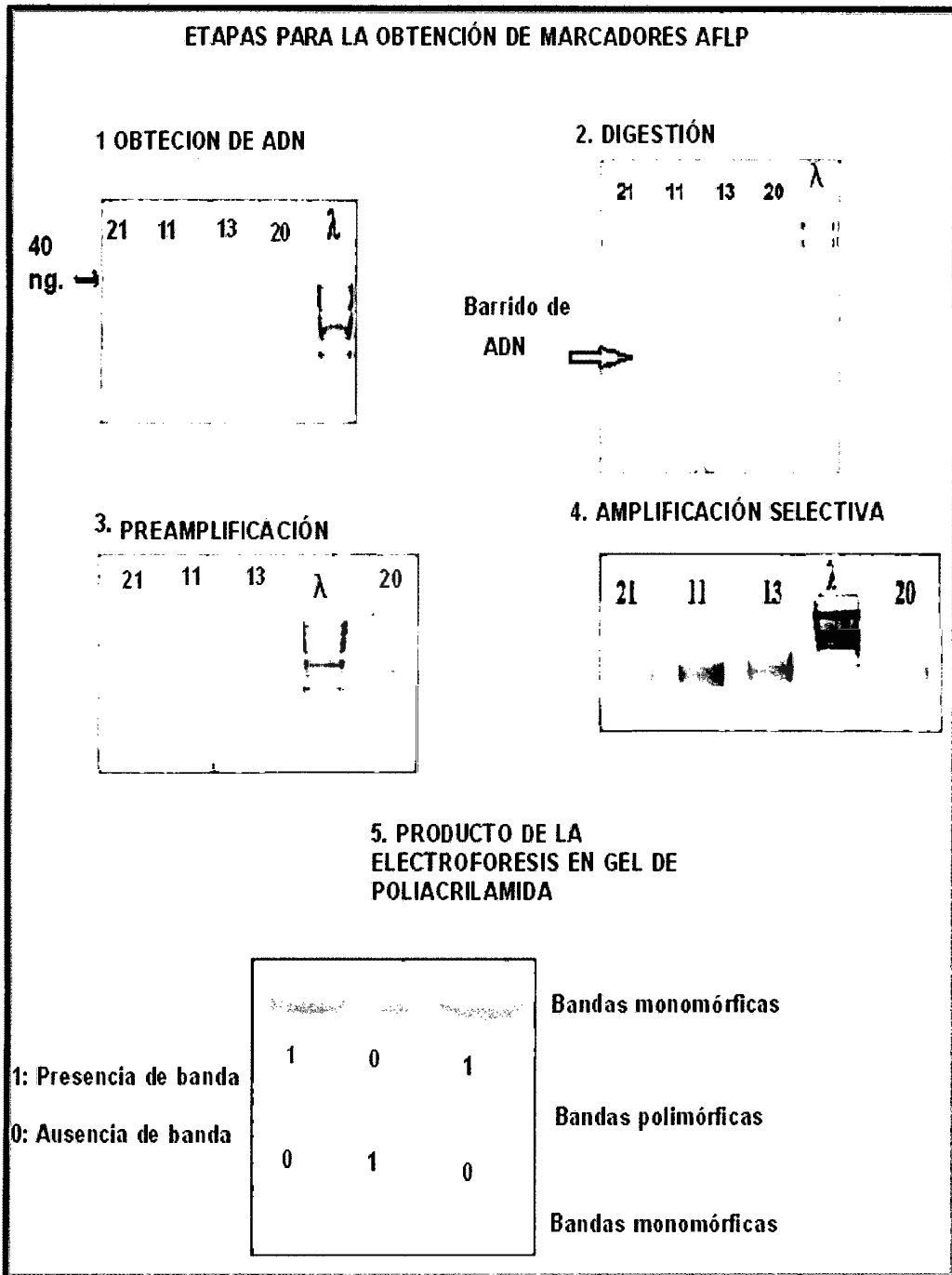


Figura N° 10. Etapas para la generación de marcadores moleculares AFLP - Laboratorio de Biología Molecular INIA - Lima, 2010.

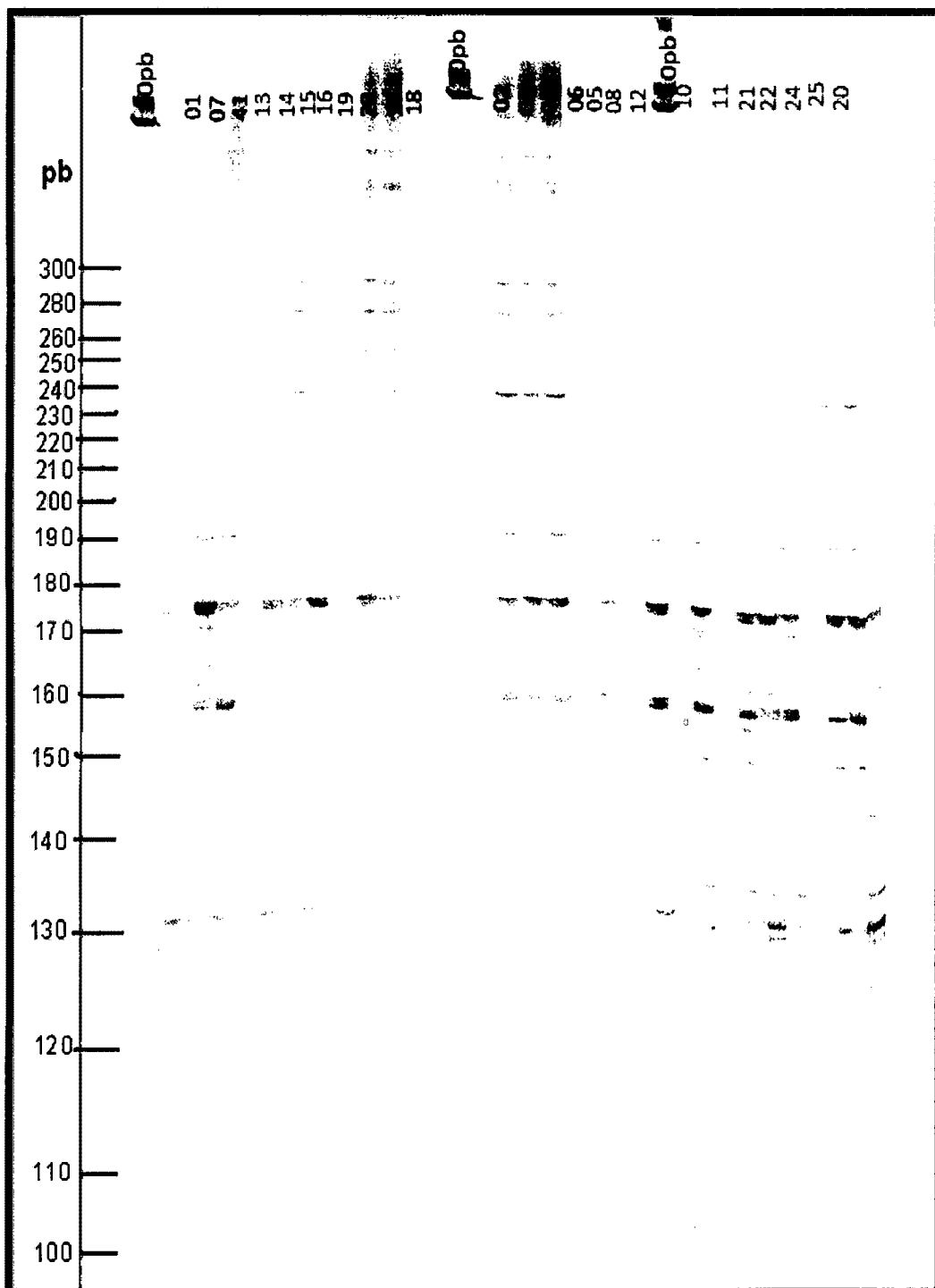


Figura N° 11. Patrones de bandas encontrados en electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% empleando la combinación de iniciadores E37 – M50 - Laboratorio de Biología Molecular INIA – Lima, 2010

**Tabla N° 08.** Número y porcentaje de bandas polimórficas y monomórficas detectadas en los patrones AFLP para los morfotipos de papas nativas de Chungui 2009 - 2010.

<b>INICIADORES AFLP</b>	<b>Bandas Mono.</b>	<b>% Bandas Mono.</b>	<b>Bandas Poli.</b>	<b>% Bandas</b>	<b>N°total de Bandas</b>
E38-M49	7	20.6	27	79.4	34
E35-M49	8	27.5	20	72.5	28
E37- M 50	7	30.4	16	69.6	23
<b>Total</b>	<b>22</b>		<b>63</b>		<b>85</b>
<b>Promedio</b>	<b>7</b>	<b>26.2</b>	<b>21</b>	<b>73.8</b>	<b>28.3</b>

Bandas Poli: Bandas polimórficas

bandas Mono: Bandas monomórficas

**Tabla N° 09.** Valores del índice de contenido polimórfico para cada una de las combinaciones de iniciadores AFLP en las papas nativas de Chungui 2009 - 2010.

<b>INICIADORES AFLP</b>	<b>ÍNDICE DE CONTENIDO POLIMÓRFICO</b>
E38- M49	0.30
E35- M49	0.38
E37 - M50	0.43

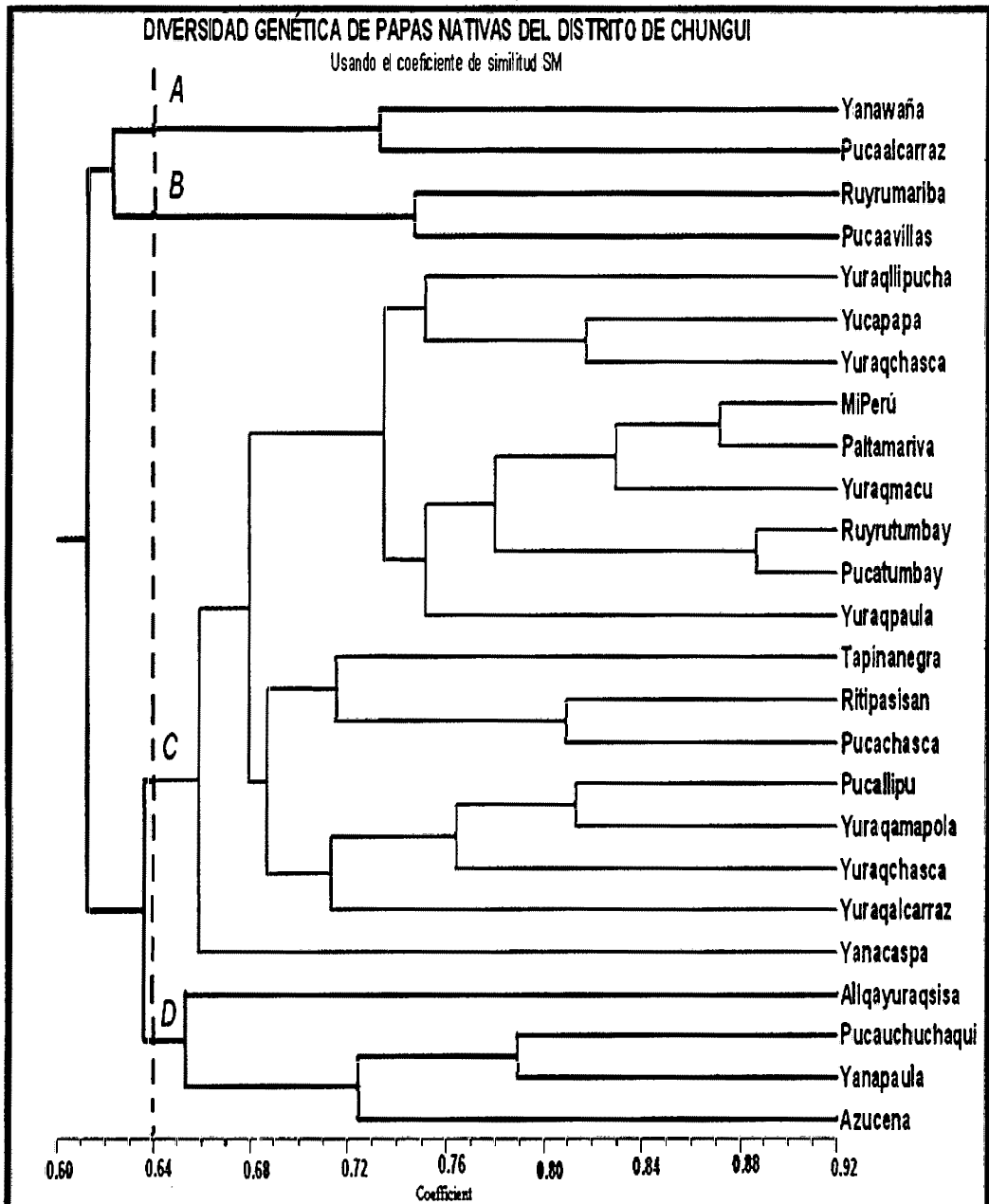


Figura Nº 12. Dendrograma de agrupamiento genético de las papas nativas de Chungui de la provincia La Mar del departamento de Ayacucho 2009 - 2010, empleando el coeficiente de similitud de Simple Matching (SM). Coeficiente de correlación cofenética:  $r = 0.7$

**Tabla N° 10.** Distribución en grupos genéticos de papas nativas de Chungui de acuerdo a su similitud genética.

<b>Grupo</b>	<b>N° de morfotipos</b>	<b>Morfotipos en los diversos grupos</b>
<b>A</b>	2	Yana waña y Puca alcarraz
<b>B</b>	2	Ruyru mariva y Puca avilla
<b>C</b>	17	Yuraq llipucha, Mi Perú, Yuraqmacu, Yuca papa, Palta mariva, Yana caspa, Tapina negra, Ritita sisan, Puka chasca, Puka llipu, Ruyru tumbay, Yuraq chasca, Yuraq amapola, Puka tumbay, Yuraq Paula, Yuraq chasca, Yuraq alcarraz
<b>D</b>	4	Allcca yuraq sisa, Puka uchuchaqui, Yana Paula y Azucena

## **CAPÍTULO V.**

### **DISCUSIÓN**

#### **5.1. USO DE LOS MARCADORES MOLECULARES AFLP EN ESTUDIOS DE DIVERSIDAD GENÉTICA.**

El uso de marcadores moleculares superan complicaciones como las que altera del medio ambiente en las características fenotípicas, ya que estas tecnologías se basan directamente en el análisis del ADN, son de utilidad no sólo en la caracterización de genotipos sino también en estudios de similitud y distancia genética (Bonamico,2004).

En la figura Nº 9, se observa buena calidad de ADN inicial por no presentar degradación ni contaminación, la cantidad fue muy variable (entre 45 y 500ng/µL). Estos resultados coinciden con el reporte de Vos y col. (1995) quienes recomiendan trabajar con ADN de buena calidad. En la digestión del ADN se utilizó 400ng de ADN Vos y col. (1995) recomiendan realizar la digestión enzimática con concentraciones de 500ng de. Sin embargo, otros autores describen la obtención exitosa de perfiles AFLP a partir de cantidades de ADN genómico menores incluso de 100ng (Gang y col., 2011)

En la figura N° 10, se observa los resultados de las etapas para la obtención de marcadores AFLP en la que fue necesario realizar evaluaciones en cada proceso desde la calidad y concentración del ADN hasta la obtención del producto final en la electroforesis en geles de poliacrilamida como lo sugieren Alagón y Rosas (2008) la evaluación de los procesos del AFLP para asegurar resultados óptimos. En la primera etapa se uniformizó las concentraciones de ADN a una concentración aproximada de 40ng/μl. En la segunda etapa que fue la digestión del ADN se observa un barrido tenue lo que indica una buena digestión enzimática que originó fragmentos de diversos tamaños como son: Msel/Msel, fragmentos, EcoRI/Msel y fragmentos EcoRI/EcoRI (Vos y col., 1995). El éxito del proceso de la ligación de adaptadores se confirmó mediante la observación de bandas en geles de agarosa producto de la pre amplificación. Fue necesario tener en cuenta el tiempo de corrida electroforética como también el voltaje, tiempo mayor a 30 minutos con 80 voltios en la electroforesis no fue posible evidenciar bandas por ser fragmentos amplificados de ADN. Al respecto Vos y col., (1995) plantean que los fragmentos originados en la pre amplificación son más ligeros y migran con facilidad en los geles de agarosa. Se consideró como resultados los geles de poliacrilamida que presentaron bandas claramente distinguibles, esta forma de lectura es sugerida y reportada por Akkale (2010).

En la tabla N° 8, muestra un total de 63 bandas polimórficas, las cuales fueron claramente diferenciables, lo que permitió diferenciar los morfotipos de papas nativas, estos resultados coinciden con lo reportado por Vos y col. (1995), quién señala que la ventaja de la técnica AFLP es la generación de un gran número de bandas.

Por las consideraciones señaladas anteriormente 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, 1998).

Koskinen (2004) señala la importancia del número de bandas para la confiabilidad de los resultados de diversidad genética empleando marcadores moleculares. Sin embargo, en la ejecución de un estudio de este tipo se ve limitado por los recursos disponibles, como reactivos de muy buena calidad así como también un correcto manejo de la técnica. Usando 3 combinaciones de marcadores AFLP se generó un total de 85 bandas claramente diferenciables, de las cuales 63 fueron polimórficas las mismas que representan el 73.8%, el cual representa un valor elevado datos que son similares a los obtenidos por Akkale (2010). El número de bandas polimórficas obtenidas por cada combinación de iniciadores es variable en estudios de diversidad genética más aún tratándose de *Solanum sp.*, por tener 8 especies con diferentes ploidías (CIP, 2006) para nuestro estudio la combinación de iniciadores E37 – M50 generó 16 bandas polimórficas en contraste a 64 bandas polimórficas reportadas por Kim (1998) para esta misma combinación en su estudio de diversidad genética de papas. La diferencia del número de bandas 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 lugar de origen de las muestras en estudio. Griffiths y col., (2002) señala que la composición genética de la población está relacionada con los procesos básicos, por lo tanto se debe examinar los cambios en la composición de la población debidos a la inmigración de individuos procedentes de otras poblaciones.

#### a. Índice de contenido polimórfico (PIC)

De la tabla N° 09, los valores de PIC obtenidos fueron de 0.43, 0.38 y 0.30 para las combinaciones de iniciadores E37-M50, E35-M49, E38-M49,

respectivamente con una media de 0.37. Bonamico y col., (2004) señala que los iniciadores con mayor PIC se presentan como más informativos para detectar la variabilidad presente en el conjunto de genotipos analizados, razón por la cual la combinación E37-M50 se puede sugerir su estudio para futuras investigaciones en papas nativas a nivel de análisis con AFLP.

Según Bonamico y col. (2008) el aumento del valor de PIC es proporcional al número de bandas polimórficas, esta afirmación coincide con los resultados obtenidos por Alagón y Rosas (2008) quienes afirman que el valor de PIC aumenta cuando aumento al número de bandas polimórficas, estos resultados son diferentes a los obtenidos en la presente investigación, donde el número de bandas polimórficas (tabla N° 08) y el valor de PIC no presentaron ninguna relación entre sí, estos resultados se ven apoyados por Saeed (2008).

**b. Análisis de similitud entre la matriz básica de datos y el dendograma mediante el coeficiente cofenético “r”**

La elección del coeficiente de similitud (o distancia genética) 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. Al respecto Rogers (1972) señala que para cálculos analíticos, es más fácil trabajar con distancias euclidianas como Simple Matching o la distancia euclidiana al cuadrado.

El coeficiente de similitud SM muestra grupos más 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).

Como se puede apreciar en la figura N° 14, el valor del coeficiente de correlación cofenética “r” fue de 0.7, lo cual indica que el dendograma tiene poca distorsión con respecto a los datos de la matriz original, este valor de “r” corresponde a un nivel medio-adeecuado como plantea Rohlf (1997).

## **5.2. DIVERSIDAD GENÉTICA**

### **a. Análisis de agrupamiento**

Los morfotipos del grupo “A” (Yana waña y Puca alcarraz) y del grupo “B” (Ruyru mariva y Puca avilla) están separadas en el coeficiente de 0.65 aproximadamente, el grupo “C” (Yuraq llipucha, Mi Perú, Yuraqmacu, Yuca papa, Palta mariva,) y el grupo “D” (Yana caspa, Tapina negra, Ritita sisan, Puka chasca, Puka llipu, Ruyru tumbay, Yuraq chascYuraq, amapola, Puka tumbay, Yuraq Paula, Yuraq chasca, Yuraq alcarraz, Allcca yuraq sisa, Puka uchuchaqui, Yana Paula y Azucena) separadas con un coeficiente de similitud genética de 0.64. Los morfotipos con mayor similitud genética corresponde al grupo “C”, estos son: Ruyru Tumbay y Puca Tumbay con una similitud de 0.87.

### **b. Discriminación de los morfotipos duplicados de papas nativas**

De acuerdo con el dendograma (Figura N° 12), no existe duplicado en ninguno de los morfotipos, es decir, no existen morfotipos con nivel de similitud genética igual a 1; Alagón y Rosas, (2008) señala que a este nivel dos o más genotipos son considerados idénticos, es decir, se habla de un mismo clon .

El análisis AFLP encontrados nos permite decir que no existe duplicado, a pesar que pueden o no presentar caracteres fenotípicos muy similares, de esta manera también descartando la posibilidad que los duplicados genéticos pudieran estar enmascarados por el medio ambiente como lo señala Griffiths y col., (2002).

### **c. Relación de los resultados moleculares con el conocimiento tradicional de las papas nativas**

Los morfotipos Yana waña, Puca alcañaz del grupo "A" y las accesiones Ruyru mariba y Puca avilla del grupo "B" son de carne de tubérculos pigmentadas al 100% pero las accesiones del grupo "C" no coinciden con esta relación, en ella también se encuentran papas pigmentadas y no pigmentadas, de igual manera no existe ninguna relación con los otros caracteres descritos en la caracterización morfológica.

Los marcadores moleculares no siempre pueden coincidir con los caracteres morfológicos puesto que las enzimas de restricción empleadas para el análisis AFLP no discriminan genes, las secuencias de reconocimiento de MseI y EcoRI no necesariamente pueden estar ubicadas en los genes, además las características morfológicas como la pigmentación, la forma del cuerpo están determinados por muchos genes que participan en complejas rutas metabólicas Griffiths, (2002) este hecho es confirmado por Solano (2007) quien en su estudio para determinar la relación existente entre los datos morfológicos y los datos analizados usando marcadores moleculares AFLP obtuvo un bajo nivel de correlación ( $r: -0.09$ ).

El cultivo de las papas nativas presenta una alta diversidad genética con una llamativa variedad de colores tanto en flores, como en tubérculos que varían en intensidad, combinaciones y tonalidades de colores. Esta diversidad morfológica fue ratificada por el análisis molecular de las 25 morfotipos estudiadas, al respecto Gómez y Roca (2008) mencionan que esta diversidad se debe en gran parte a que las papas nativas crecen en condiciones agroecológicas muy particulares inclusive en la que otros productos no podrían prosperar, se suma a ello la cosmovisión del agricultor de conservar esta diversidad genética. Saeed

(2009) menciona que la alta variación genética de papas por regiones tiene muchas causas, entre ellas su alta heterocigocidad de especies tetraploides con un gran número de genes.

La figura N° 12, nos muestra que aun coeficiente de similitud de 0.64 los los morfotipos de papas nativas se dividieron en 4 grupos genéticos, los cuales son los grupos A, B, C y D. Existen morfotipos con mayor similitud genética (0.88) que corresponde a los morfotipos Ruyru tumbay y Puca tumbay. Debido a esta gran variabilidad genética, las papas cultivadas son altamente heterocigotos: el cruzamiento aún dentro de la misma variedad, produce una progenie (o hijos) altamente variable. Por esta razón, la pureza varietal solo puede mantenerse por reproducción asexual o vegetativa. (Arce, 2002).

Esta diversidad también se debe a que a menudo existen híbridos naturales de la polinización sexual que son incorporados involuntariamente a los cultivos de papa (Sukhotu y col. 2005).

La tecnología del AFLP nos permitió hacer un estudio cercano de la diversidad genética de papas nativas del distrito de Chungui, no se encontró morfotipos duplicados.

## **CAPÍTULO VI.**

### **CONCLUSIONES**

1. La combinación de iniciadores E37 – M50 con índice de contenido polimórfico de 0.43, fue la combinación más informativa para el análisis de diversidad genética de papas nativas de Chungui.
2. El índice de correlación cofenética del análisis de agrupamiento genético de las papas nativas de Chungui fue de 0.7, lo que indica que el agrupamiento genético tuvo buena correspondencia del dendograma con respecto a la matriz básica de datos originales.
3. No se encontró morfotipos duplicados de papas nativas en el distrito de Chungui 2009.
4. Con un coeficiente de similitud de 0.64, las papas nativas de Chungui se agruparon por sus características genéticas en 4 grupos: grupo A: con dos morfotipos, el grupo B: con dos morfotipos Ruyru mariva y Puca avilla, grupo C: con 18 morfotipos y el grupo D con 4 morfotipos de papas nativas.

## **CAPÍTULO VI.**

### **CONCLUSIONES**

1. La combinación de iniciadores E37 – M50 con índice de contenido polimórfico de 0.43, fue la combinación más informativa para el análisis de diversidad genética de papas nativas de Chungui.
2. El índice de correlación cofenética del análisis de agrupamiento genético de las papas nativas de Chungui fue de 0.7, lo que indica que el agrupamiento genético tuvo buena correspondencia del dendograma con respecto a la matriz básica de datos originales.
3. No se encontró morfotipos duplicados de papas nativas en el distrito de Chungui 2009.
4. Con un coeficiente de similitud de 0.64, las papas nativas de Chungui se agruparon por sus características genéticas en 4 grupos: grupo A: con dos morfotipos, el grupo B: con dos morfotipos Ruyru mariva y Puca avilla, grupo C: con 18 morfotipos y el grupo D con 4 morfotipos de papas nativas.

## **CAPÍTULO VII.**

### **RECOMENDACIONES**

1. El presente trabajo permite un acercamiento a la caracterización molecular de las papas nativas de Chungui. Sin embargo es recomendable profundizar los estudios de diversidad genética con otras técnicas moleculares como son los microsatélites.
2. Es indispensable disponer de información descriptiva debidamente organizada de la caracterización morfológica y agronómica. Sin esta información no se podría hacer uso de este material para procesos de mejoramiento.
3. Para la ejecución de trabajos de investigación en diversidad genética haciendo uso de marcadores moleculares, tener muy en cuenta la Bioseguridad, por trabajarse con reactivos que son altamente mutágenos.
4. Realizar trabajos de investigación con la participación activa de los productores agrarios encaminados a la conservación y uso sostenible de la gran diversidad de los recursos genéticos que dispone nuestra región.



URL:[http://books.google.com.pe/books?id=g8PViAVW1OYC&dq=diversidad+genetica,+de+especie+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs\\_navlinkss](http://books.google.com.pe/books?id=g8PViAVW1OYC&dq=diversidad+genetica,+de+especie+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs_navlinkss)

- 7.- **Centro Internacional de la Papa.** 1997. Informe Anual.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=JdCwioYOY94C&dq=diversidad+genetica+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=JdCwioYOY94C&dq=diversidad+genetica+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs_navlinks_s).
8. - **Cheng, F., Brown, S., Weeden, N.** 1997. DNA extraction protocol from varios tissues in woody species. Hortscience 32(5): 921-922.
- 9.- **CIMMYT.** 2006 Protocolos de laboratorio: Laboratorio de Genética Molecular Aplicada del CINMYT. Tercera edición. México, D.F.: CIMMYT.
- 10.- **Clifford, H. and Stephenson, W.** 1975. An introduction to numerical classification, Academic Press, Nueva York.
- 11.- **Couch, J. and Fritz, P.** 1997. Isolation of AND from plants hig in polyphenolics.  
URL:<http://www.mgel.msstate.edu/pubs/Peterson%20et%20al%201997.pdf>
- 12.- **Crisci, J. y López, M.** 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografías N°26, Serie de Biología, programa de monografías científicas, OEA, Washinton D.C, U.S.A. 128p.
- 13.- **Cubero, I.** 2003. Introducción a la mejora genética vegetal.  
URL:[http://books.google.com/books?id=R7BbEm3uQ2kC&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com/books?id=R7BbEm3uQ2kC&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- 14.- **Dajos, R.** 2002. Tratado de ecología.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=Dts0snayvm8C&dq=tratado+de+ecologia,+diversidad+genetica&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=Dts0snayvm8C&dq=tratado+de+ecologia,+diversidad+genetica&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- 15.- **Dellaporta, S., Wood, J., Hicks, J.** 1983. Aplant DNA minipreparation: versión II. Plant Molecular Biology. Reporter 1(4): 19-21.
- 16.- **Egúsqiiza, B.** 2000. La papa: producción, transformación y comercialización

URL:[http://books.google.com/books?id=6ciGbBX0uFwC&dq=valor+nutritivo+de+la+papa+nativa&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com/books?id=6ciGbBX0uFwC&dq=valor+nutritivo+de+la+papa+nativa&hl=es&source=gbs_navlinks_s)

- 17.- **Estrada, N.** 2000. La biodiversidad en el mejoramiento genético de la papa.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=AcB7\\_VJolocC&dq=citogenetic+a+de+las+papas+nativas&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=AcB7_VJolocC&dq=citogenetic+a+de+las+papas+nativas&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- 18.- **Estrella, J.** 2005. Biodiversidad y recursos genéticos: una guía para su uso y acceso en el Ecuador.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=xu7v9EeVTNoC&dq=diversidad+genetica+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=xu7v9EeVTNoC&dq=diversidad+genetica+de+papas+nativas&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- 19.- **Fang, W., Fangdi, L., Jian, W., Yun Z., Haihong S.** 2011. Genetic Diversity of the Selected 64 Potato Germplasms Revealed by AFLP Markers.  
URL:<http://bio.sophiapublisher.com/html-132-5->
- 20.- **Ferreira, M. and Grattapaglia, D.** 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis genético
- 21.- **Fonseca, M., Mateus, A. y Contreras, B.** 2010. Prácticas de Laboratorio de Biología Molecular: Su Aplicación en Genética.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=vG3FdDU0nC4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs\\_ge\\_summary\\_r&cad=0#v=onepage&q&f=false](http://books.google.com.pe/books?id=vG3FdDU0nC4C&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false)
- 22.- **Freifelder, D.** 1991. Técnicas de bioquímica y de biología molecular 1ra edición. Editorial Reverse Mexicana. p: 234-260.
- 23.- **Gang, H., Na, L., Zhan, X., Tian, G.** 2011. Genetic and phylogenetic analysis of ten Gobiidae species in China based on amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis  
URL:<http://www.academicjournals.org/AJB/PDF/pdf2011/7Sep/Han%20et%20al.pdf>
- 24.- **Ghislain, M., Daapeng, Z., Fajardo, D., Huaman, Z. y Hijmans, J.** 1999. Marker assisted samplig of the cultivated. Andean potato *Solanum phureja* collection using RAPD markers. Genetic Resources and Crops Evolution. 1(46): 547-555.

- 25.- **Gomez, R., Roca, W.** 2008. Papas nativas del Perú (Año internacional de la papa 2008). Catálogo de variedades y usos gastronómicos. Ministerio de Agricultura, Lima.
- 26.- **Gonzales, A., Pita, J.** 2001. Conservación y Caracterización de Recursos Filogenéticos. I.N.E.A. Valladolid. 279p.
- 27.- **González, A.** 2010. Reacción en cadena de la polimerasa.  
URL:<http://www.botanica.cnba.uba.ar/Pakete/Dibulgeneral/PCR/PCR.htm>
- 28.- **Griffiths, F., Miller, H., Suzuki, T., Lewontin, C., Gelbart, M.** 2002. Genética Séptima Edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana.
- 29.- **Gutiérrez, R.** 2008. Papas nativas desafiando al cambio Climático.  
URL: <http://books.google.com.pe/books?id=X0ygUynfRu8C&pg=PP1&dq=Papas+nativas+desafiando+al+cambio+Clim%C3%A1tico#v=onepage&q=&f=false>.
- 30.- **Karp, A. And Edwards, K.** 1998. DNA markers: a global overview. In: G. Caetano – Anollés, P.M. Eds. DNA markers: protocols, applications and overviews. Gresshoff. New York. p. 1-13.
- 31.- **Karp, G.** 2006. Biología Celular y Molecular conceptos y experimentos. Cuarta Edición. Edit. Mc Graw Hill Interamericana.
- 32.- **Kemp, R. Namkoong, G., Wadsworth, F.** 1995. Conservación de los recursos genéticos en la ordenación de los bosques tropicales: principios y conceptos.  
URL: [http://books.google.com.pe/books?id=4otDKDdlUcC&dq=Diversidad+Gen%C3%A9tica&hl=es&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=4otDKDdlUcC&dq=Diversidad+Gen%C3%A9tica&hl=es&source=gbs_navlinks_s)
- 33.- **Kim, J., Joung, H., Kim, H., Lim, P.** 1998. Estimation of genetic and relationship in potato (*Solanum tuberosum* L.)  
URL: <http://www.springerlink.com/content/34378061tp710627/fulltext.pdf>
- 34.- **Kneller, G.** 1978. Science as a Human endeavor, Columbia Univ. press, Nueva York. 33.

- 35.- **Leyle, G.** 1995. Guía del Convenio sobre la Diversidad Biológica.  
URL:[http://books.google.com/books?id=kZE4MrjJn4cC&dq=Gu%C3%ADa+del+Convenio+sobre+la+Diversidad+Biol%C3%B3gica&hl=es&source=gb\\_s\\_navlinks\\_s](http://books.google.com/books?id=kZE4MrjJn4cC&dq=Gu%C3%ADa+del+Convenio+sobre+la+Diversidad+Biol%C3%B3gica&hl=es&source=gb_s_navlinks_s)
- 36.- **Lehninger, A.** 1991. Bioquímica 2da Edición. Ediciones Omega, Barcelona
- 37.- **Mostacero, L., y Freddy M.** 1993. Taxonomía de Fanerógamas Peruanas. CONCYTEC Lima Perú.
- 38.- **Mullis, K. and Faloona, F.** 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335–350.
- 39.- **Murashige, T. and Skoog, F.** 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* 15(3): 473-497.
- 40.- **Nunziata, A., Ruggieri, V., Greco, N., Frusciante, L., Barone, A.** 2010. Genetic Diversity within Wild Potato Species (*Solanum* spp.) Revealed by AFLP and SCAR Markers. *American Journal of Plant Sciences*, 1: 95-103.
- 41.- **Ochoa, C.** 2003. Las papas del Perú. Base de datos 1947 – 1997 CIP Lima.
- 42.- **Otazú, V.** 2001. Reconocimiento a los Conservadores de la Biodiversidad de la papa, en 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.
- 43.- **Passarge,** 2010. Genética.  
URL:[http://books.google.com.pe/books?id=bgQ\\_xyJYkigC&hl=es&source=gb\\_s\\_navlinks\\_s](http://books.google.com.pe/books?id=bgQ_xyJYkigC&hl=es&source=gb_s_navlinks_s)
- 44.- **Peña, G., Tenorio, M., Vila, P., Cortez, R., Hermoza, E., Leon, E., y 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. Trabajo de la Facultad de

Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga, Ayacucho- Perú.

- 45.- **Picca, A., Hclguera, M., Salomón, N. y Carrera.** 2004. Marcadores moleculares. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina.
- 46.- **Saeed. N.** 2009. AFLP markers for the assessment of genetic diversity in european and North American potato varieties cultivated in Iran  
URL:<http://www.sbmp.org.br/cbab/siscbab/uploads/c8129491-56e1-0e59.pdf>
- 47.- **Sneath, P., Sokal, R.** 1963.Principles of numerical taxonmomy.W.H. Freeman y Co.USA.319p.
- 48.- **Sneath, P. y Sokal, R.** 1973. Numerical Taxonmomy: The principles and practice of numerical classification. Freeman y co. San Francisco, USA. 573p.
- 49.- **Sevilla, R. y Holle, M.** 2004. Recursos genéticos vegetales. Luis León Asociados S.R.L. 445p.
- 50.- **Spooner, D., McLean, K., Ransay, G., Waugh, R., Bryan, G.** 2005 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.
- 51.- **Senior, M., Murphy, M., Etuber,C.W.** 1998.Utility of SSR for determining genetic similitities and relationships in Maize using an Agarose gel system. Corp Science.38: 1088-1098.
- 52.- **Solano, S., Morales. U., Anabalón. R.** 2007. Molecular description and similarity relationship among native germoplasma potatoes (*Solanum tuberosum* ssp. *Tuberosum* L.) using morphological data and AFLP markers.
- 53.- **Rohlf, F.** 1970. NTSYS pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, version 201. Departament of Ecology and Evolution State University of New York.

- 54- Rogers, J., 1972. Measures of similarity and genetic distance. *Studies in genetics VII*. U: Texas Publ. 7213: 145-153.
- 55.- Tanksley, S. 1989. RFLP mapeo en plantas: Nuevas herramientas para una
- 56.- Túpac, Y. 2001. Postcosecha y Comercialización de Tubérculos Andinos con Énfasis en papas Nativas y Ulluco. Ministerio de Agricultura del Perú, Instituto Nacional de Investigación Agraria, INIA, Centro Internacional de la Papa, CIP. Agosto de 2001.
- 57.- Valadez, M. y Kahl, G. 2000 Huellas de ADN de genomas de plantas (teoría y protocolos de laboratorio). Edición original de Mundi-Prensa México, S.A. de C.V. 148 p
- 58.- 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*
- 59.- Vos, P., Bleeker, M., Reijans, M., Van, T., Hornes, M., Frijters, A., Pot, J., Peleman, J., Kuiper, M. 1995. AFLP.  
URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC307397/pdf/nar000210189.pdf>.
- 60.- Winzer, N., Di Renzo, M., Olmos, S. 2004. Métodos para estimar la variabilidad genética. *Biotecnología y mejoramiento vegetal*. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina.
- 61.- Zhang, D. and Hewitt, G. 1998. Isolation of DNA from preserved specimens. En: Karp, A., PG, Isaac and D.S. Ingram (eds. *Molecular tools for Screening Biodiversity – Plants and Animals First Edition*. Chapman and Hall. Pg: 41-45.

## **ANEXO**

**Tabla N° 11.** Datos pasaporte de los 25 morfotipos de papas nativas del distrito de Chungui de la provincia La Mar departamento de Ayacucho, 2009.

N°	NOMBRE COMUN	LOCALIDAD	ALTITUD	Latitud	Recolectores
1	Yana waña	Union Libertad de Rumichaca	3290	13°10'56,01" S 73°35'59,02" O	Gilmar P. y Félix P.*
2	Yuraq llipucha	Union Libertad de Rumichaca	3290	13°10'56,01" S 73°35'59,02" O	Gilmar P. y Félix P.*
3	Mi Perú	Union Libertad de Rumichaca	3290	13°10'56,01" S 73°35'59,02" O	Gilmar P. y Félix P.*
4	Yuraqmacu	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
5	Yuca papa	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
6	Palta mariva	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
7	Yuraq chasca	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
8	Puca alcarraz	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
9	Yana caspa	Sachawarqa -Union Libertad deRumichaca	4138	13°10'18,99" S 73°38'28,14" O	Gilmar P. y Félix P.*
10	Tapina negra	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
11	Ritipa sisan	Moroqocha - Union Libertad deRumichaca	3378	13°10'52,78" S 73°36'13,82" O	Gilmar P. y Félix P.*
12	Allqa yuraqsisa	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
13	Puca uchuchaqui	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
14	Yana paula	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
15	Azucena	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
16	Puca chasca	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
17	Ruyru tumbay	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
18	Ruyru mariba	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
19	Puca avillas	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
20	Puca llipu	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
21	Yuraq chasca	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
22	Yuraq amapola	Union Libertad de Rumichaca	3290	13°10'56,01" S 73°35'59,02" O	Gilmar P. y Félix P.*
23	Puca tumbay	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
24	Yuraq alcarraz	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*
25	Yuraq paula	Sillaccasa - Union Libertad de Rumichaca	3868	13°10'50,36" S 73°38'18,47" O	Gilmar P. y Félix P.*

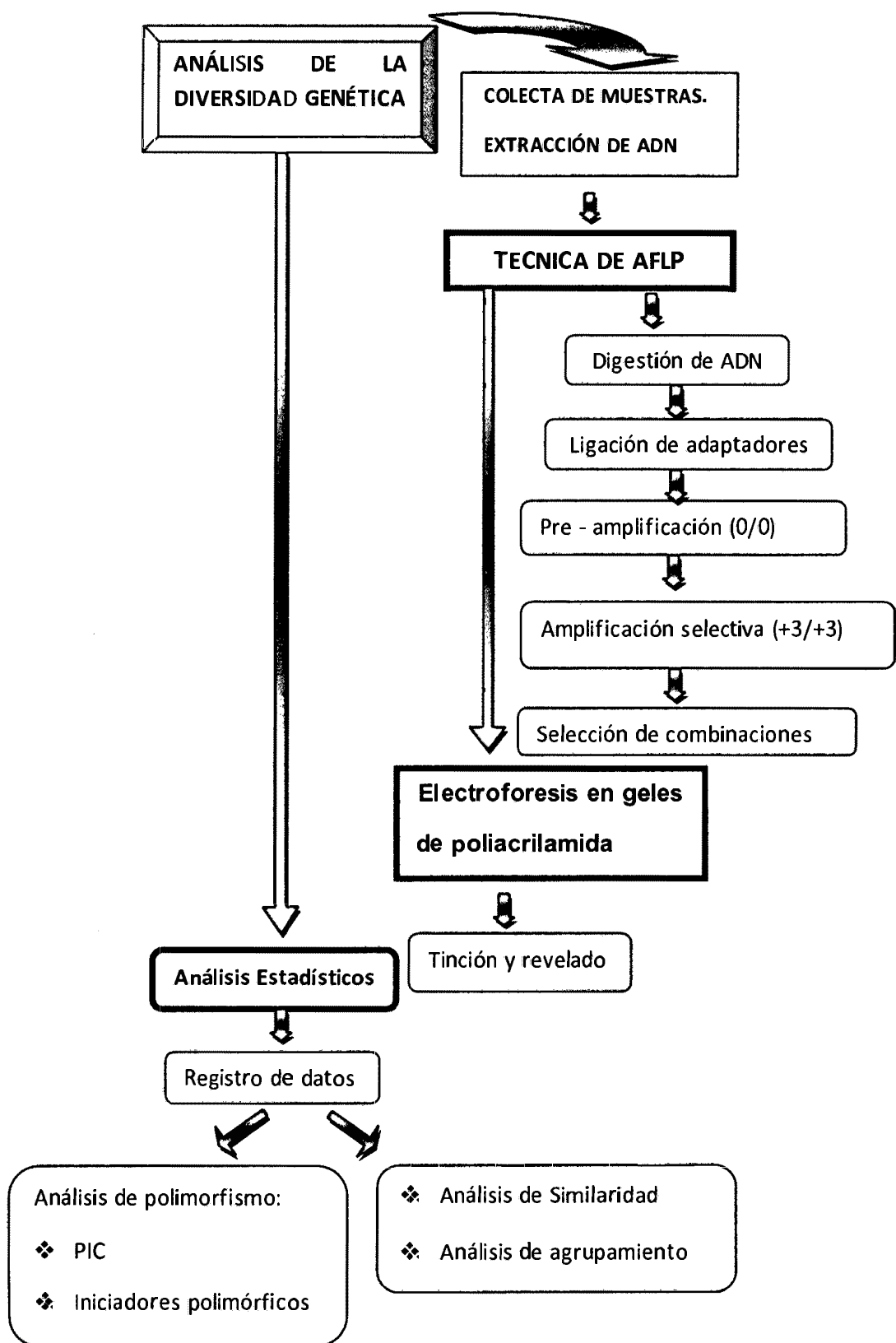
Recolectores: Gilmar Peña y Félix Pariamanco, este último es el productor es el productor de papas nativas de lo comunidad de Unión Libertad de Rumichaca



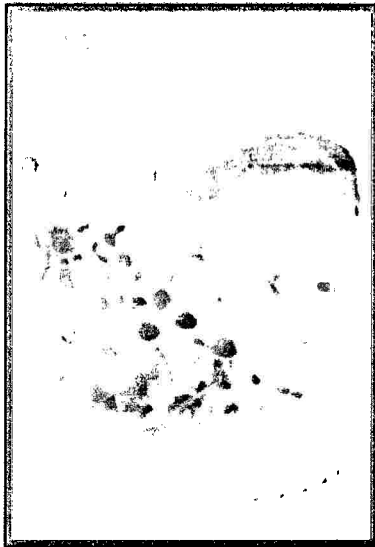
**Tabla Nº 12.** Caracterización morfológica externa de los morfotipos de papas nativas procedentes del distrito de Chungui, provincia de La Mar –Ayacucho.

Nº	Cultivar (c.v)	Color de piel	Distribución de color	Tipo de piel	Color de la carne	Forma general
1	“Yana waña”	Morado	100%	Liso	Morado	Ovalado
2	“Yuraq llipucha”	Blanco morado	90% blanco	Liso	Blanco	Oblongo
3	“Mi Perú”	Rojo	100%	Liso	Rojo	Redondo achatado
4	“Yuraqmacu”	Blanco	100%	Liso	Blanco	Ovalado
5	“Yuca papa”	Guindo	100%	Rugoso	Guindo blanquecino	Oblongo
6	“Palta mariva”	Morado	100%	Liso	Blanco	Ovalado
7	“Yuraq chasca”	Blanco morado	90% blanco	Liso	Blanco	Redondo
8	“Puka alcarraz”	Rojo	100%	Rugoso	Rojo blanquecino	Oblongo
9	“Yana caspa”	Negro	100%	Rugoso	Negro morado	Largo oblongo
10	“Tapina negra”	Negro	100%	Rugoso	Negro	Oblongo
11	“Ritita sisan”	Morado blanco	50% morado	Rugoso	Blanco	Oblongo
12	“Alcca yuraq sisa”	Blanco	100%	Rugoso	Blanco	Redondo achatado
13	“Puka uchuchaqui”	Rosado	100%	Liso	Blanco	Ovalado
14	“Yana Paula”	Negro	100%	Liso	Negro	Ovalado
15	“Azucena”	Guindo	100%	Rugoso	Guindo	Oblongo
16	“Puka chasca”	Guindo rojizo	100%	Rugoso	Guindo blanquecino	
17	“Ruyru tumbay”	Amarillo	100%	Rugoso	Amarillo	Redondo achatado
18	“Ruyru mariva”	Morado	100%	Rugoso	Blanco	Ovalado
19	“Puka llipu”	Rojo morado	80% Rojo	Rugoso	Rojo Blanquecino	Redondo achatado
20	“Puka avillas”	Guindo	100%	Liso	Guindo	Redondo achatado
21	“Yuraq chasca”	Blanco	100%	Rugoso	Blanco	Redondo
22	“Yuraq amapola”	Blanco morado	90%	Rugoso	Blanco	Compri- mido
23	“Puka tumbay”	Rojo	100%	Rugoso	Rojo blanquecino	Redondo achatado
24	“Yuraq alcarraz”	Amarillo	100%	Rugoso	Amarillo	
25	“Yuraq Paula”	Blanco	100%	Liso	Blanco	Ovalado

Fuente: Caracterización y valoración de *solanium sp* “papas nativas” de los distritos de Anco y Chungui - provincia La Mar – Ayacucho. 2008 -2009.Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga



**Figura Nº 13.** Flujograma para el análisis de la diversidad genética de papas nativas del distrito de Chunguí, provincia La Mar del departamento de Ayacucho empleando marcadores moleculares AFLP.



**Figura N° 14.** Cultivo *in vitro* de los morfotipos de papas nativas, laboratorio de Biología Molecular de la UNSCH. 2010.

## Protocolo N° 1

**Protocolo para la extracción de ADN genómico de plantas a pequeña escala, método CTAB modificado de los protocolos del CIP, 1997.**

1. Pesar 200mg de tejido fresco (específicamente hojas jóvenes), congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .
2. Triturar la muestra en un mortero pre-congelado, utilizando 1400 $\mu\text{L}$  de tampón CTAB 2X, hasta obtener un homogenizado completo. Transferir a dos tubos Eppendorf nuevo esterilizados, aproximadamente 700 $\mu\text{L}$  de muestra a cada uno.

### Buffer de extracción CTAB 2X

Reactivo stock	CC.Final	100mL
CTAB	2%	2.0g
NaCl 5M	1.4M	28mL
EDTA 0.5M (PH 8.0)	20mM	4.0mL
Tris:HCl 1M (PH 8.0)	100Mm	10.0mL
PVP	1%	1.0mL
H <sub>2</sub> O dd.		Hasta 100mL

3. Luego adicionar de inmediato 2 $\mu\text{L}$  de  $\beta$ - mercaptoetanol en campana de extractora de aire. Agitar en vortex o a mano bien. Incubar las muestras en baño maría a  $65^{\circ}\text{C}$  por 45 min, agitar suavemente las muestras cada 15 min. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente  $25^{\circ}\text{C}$  aprox. por 4 a 5 minutos.

4. Se agrega 670 $\mu$ L de cloroformo y 30 $\mu$ L de alcohol isoamilico a cada tubo. Se mezcla muy bien por agitación manual para evitar dañar el ADN.
5. Centrifugar las muestras a 14 000rpm por 5 minutos, transfiriendo el sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf esterilizado. Tener cuidado de absorber la interfase. Descartar el cloroformo/alcohol isoamilico remanente. Mantener los tubos invertidos y abiertos sobre un papel absorbente, para que se evapore el cloroformo/alcohol isoamilico residual.
6. Agregar 50 $\mu$ L de tampón CTAB 10X, agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.

**Buffer de extracción CTAB 10X**

<b>Reactivo</b>	<b>CC. Final</b>	<b>100mL</b>
CTAB	10%	10g
NaCl 5M	0.7M	14mL
EDTA 0.5M (PH 8.0)	20mM	4mL
Tris:HCl 1M (PH 8.0)	100mM	10mL
H <sub>2</sub> O dd.		Hasta 100mL

7. repetir los pasos 4 y 5.
8. Se agregó 400 – 500 $\mu$ L de Isopropanol frio a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejarlos en refrigeración a 4<sup>o</sup>C por 30min ó 15min a -20<sup>o</sup>C.  
**Alternativa:** Es posible conservar las muestras en refrigeración en este paso hasta el día siguiente.

9. Centrifugar las muestras a 14 000 rpm durante 20min. Se elimina cuidadosamente el sobrenadante para no perder el precipitado de ADN. Dejar que el precipitado seque invirtiendo los tubos abiertos por unos 2 min.
10. Lavar el precipitado de ADN con 1mL de etanol al 70%( por 3 min.) logrando así desprender el pellet, centrifugar las muestras a 13 000 rpm durante 15 min. Eliminar con cuidado el etanol y agregar 1mL de etanol al 90%, centrifugar las muestras a 13 000 rpm durante 15 min y eliminar el etanol. Dejar que el precipitado seque de 20 - 30min, dejándo los tubos abiertos e invertidos sobre papel absorbente.
11. Disolver el precipitado de ADN en 50µL a 100uL de T10E1 o H<sub>2</sub>O d., agregar 2µL de ARNasa libre de ADNasa (10mg/mL) agitar suavemente.
12. **Nota:** Se debe considerar la cantidad de pellet observado para realizar la resuspensión con T10E1 debe ser concentraciones bajas, puesto que a concentraciones poco diluidas podrían interferir en procesos de PCR más aún si se trabaja con AFLP., por contener EDTA en su composición.

#### Tampón T10E1

Stock	Final	0,4L
Tris-HCl 1M,pH 8.0	0.01M	4mL
EDTA 0.5M,pH 8.0	0.001M	0.8mL
H <sub>2</sub> O d.		400mL

## PROTOCOLO N° 2

### Protocolo para determinar la concentración de ADN, (molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping Training Manual CIP, 2000)

1. Preparar agarosa al 1% (2.8g de agarosa en 280mL de tampón TBE 1X), se disuelve en Horno.

#### Tampón TBE 10X

Reactivo stock	CC.Final	1L
Tris:base	0.9M	108g
Acido bórico	0.9M	55g
EDTA 0.5M (PH 8.0)	20mM	40mL
H <sub>2</sub> Od.		Hasta 1000mL

2. Se tomó 2µL del ADN y se diluyo en 8µL del colorante o tampón de carga para geles de agarosa SALB 1X proveniente de la dilución de SALB 10X. Las muestras así preparadas fueron cargadas en los pocillos de gel de agarosa, se cargó en otro pocillo 10µL del marcador (λ), el cual nos permitió calcular la concentración por comparación, la primera banda corresponde a una concentración conocida (280ng/uL).

#### Tampón de carga para geles de agarosa (SALB 10X)

Stock	Final	50mL
Azul de bromofenol	0.15%	75mg
Xilen cianol	0.15%	75mg
Naranja G	0.20%	100mg
Sucrosa	60%	30g
TBE 10X	0.5x	2.5MI
H <sub>2</sub> Odestilada Milli Q		

3. Se realizó la corrida electroforética a 100 V y 60 mA por 40 min.

Después de la electroforesis el gel fué coloreado con Bromuro de Etidio, luego fué visualizada y registrada en el fotodocumentador: Molecular Imager chemidoc™, (BIO- RAD).

Sol. Stock de Bromuro de Etidio

Reactivo	CC. Final	100mL
BrEt.	10mg /mi	1000mg
H <sub>2</sub> O dd.		100mL

Sol. De trabajo de Bromuro de Etidio

Reactivo	CC. Final	CC. Final	100mL
BrEt.	10mg /MI	1ug/mL	100µL
H <sub>2</sub> O dd.			100mL

**Nota:** El Bromuro de Etidio es altamente mutágeno y carcinógeno.

Preparación del ADN del fago ( $\lambda$ ) digerido con Pst I

Reactivos	Cantidad
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	(*)
Buffer 10X para PstI	45µL
ADN del fago lambda	50µg
Pst I (10U/µL)	5µL
Volumen total	450 µL

(\*) Volumen necesario para completar 450µL

Incubar a 37°C por 3 horas. Luego agregar 50µL de tampón de carga SALB 10X.



### PROTOCOLO N° 3

#### Digestión de ADN genómico adaptado de: Molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping Training Manual CIP, 2000

1. A 10µL de ADN de concentración de 40ng/µL, se adicionó 10µL del MMX.
2. (ˆ) Se Incubó los tubos a 37°C toda la noche.

#### Mix para la digestión del ADN genómico

Reactivos	µL	Concentración Final
Buffer de restricción 5X	4	1X
MseI Invitro gen (5 U/µL)	0.2	1U
EcoRI Fermentas (10 U/µL)	0.5	5U
ADN (40ng./µL)	10	400ng. (ˆ)
H <sub>2</sub> O Milli Q	5.3	
Volumen final	20	

3. Verificar la digestión, corriendo 10µl de la muestra por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v). Se debe observar un barrido o smear a lo largo del carril de corrida electroforética de cada muestra.

(ˆ) El tiempo de incubación para la digestión enzimática de ADN con EcoRI y MseI se realiza a 37 grados por 3 horas, dependiendo las especificaciones del producto, en este caso se empleo toda la noche para asegurar la digestión enzimática.

(ˆ) Generalmente la digestión se realiza con 500 ng de ADN.

## PROTOCOLO N° 4

### Preparación de adaptadores tomado y adaptado de: Molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping Training Manual CIP 2000

1. La preparación de adaptadores se realizó por dilución a 100µM a partir de las concentraciones iniciales (provistas en el etiquetado los reactivos).

#### Dilución de Adaptadores

Adaptadores	µg./mL.	nm.	Concentración	
			µL.H2O Milli Q	Final ( µM)
Eco A1 : (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3')	5.147	43.74	437.4	100
Eco A2 : (5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3')	4.593	42.84	428.4	100
MseI A1: (5'-GACGATGAGTCCTGAG-3')	4.947	32.42	324.2	100
MseI A2 : (5'-TACTCAGGACTCAT-3')	4.224	43.74	432.3	100

2. Se hibridó los adaptadores de cada par por separado Eco A1 con Eco A2 y MseI A1 con MseI A2.
3. Se llevó al termociclador a 65°C por 5 minutos, luego se sacó y se dejó a temperatura ambiente (20°C aprox.) por 30 minutos, luego se almacenó a -20°C.

## PROTOCOLO N° 5

### Reacción de ligación de adaptadores, tomado y adaptado de: **Molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping Training Manual CIP, 2000**

1. Se agregó 8µL del MMx de ligación a 20µl del ADN digerido, se mezcló muy bien en una centrifuga para microtubos por 7 a 10 segundos aproximadamente.

#### Mix para la reacción de ligación

Reactivos	µL	Concentración Final
Buffer T4 ligasa Invitro gen 5X	5	0.9X
Adaptador Mse I Invitro gen (50U/µL)	1	50U
Adaptador Eco Invitro gen (5U/µL)	1	5U
T4 ADN ligasa Invitro gen(5U/µL)	0.4	2U
ADN	20	
H <sub>2</sub> O MilliQ	0.6	
Volumen total	28	

2. El mix así preparado se llevo a incubar a temperatura ambiente (20°C aprox.) toda la noche.
3. Finalmente se almacenó las muestras a -20°C hasta realizar la pre – amplificación.

## PROTOCOLO Nº 6

**Pre amplificación de los fragmentos digeridos y ligados, tomado y adaptado de: Molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping training manual CIP, 2000.**

1. Se descongeló la muestra del producto de la digestión a temperatura ambiente.

Mix de reacción para la pre amplificación

Reactivos	$\mu\text{L}$	Concentración Final
H <sub>2</sub> O	15.55	
10X PCR Buffer	2.50	1X
dNTP mix(5mM)	1.25	250 $\mu\text{M}$
EcoRI+0 primer In vitro gen(50ng/ $\mu\text{L}$ )	1.00	50ng
MseI+0 primer In vitro gen(50ng/ $\mu\text{L}$ )	1.00	50ng
Taq polymerase Promega (5U/ $\mu\text{L}$ )	0.20	1U
MgCl <sub>2</sub> Promega (25mM)	1.50	1.5Mm
ADN digerido y ligado( )	2.00	
Volumen Total	25.00	

2. Se tomó 2 $\mu\text{L}$  de ADN digerido y ligado sin dilución
3. Se añadió 23 $\mu\text{L}$  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.

(\*) El ADN normalmente para esta etapa es diluido, en este caso no se diluyó por tratarse de concentraciones ligeramente menores a las recomendadas.

## PROTOCOLO Nº 7

### Amplificación selectiva (Molecular Biology Laboratory Protocols Plant Genotyping Training Manual CIP, 2000)

Para ejecutar este proceso se debe considerar que todo el proceso de preparación del mix antes de ser llevados al termociclador se trabajan a bajas temperaturas, en nuestro caso se trabaja sobre hielo para mantener las condiciones óptimas de los reactivos, por otro lado también el empleo de enzimas se hace al final de todo el proceso

#### Secuencias de los iniciadores AFLP

Nombre	Enzima	Tipo	Secuencia ( 5' – 3')
E 35	Eco RI	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'

#### Mix para el proceso de amplificación - selectiva

REACTIVOS	µl	Concentración Final
10X PCR Buffer	1.1	1.1X
dNTP (5mM)	0.6	0.3Mm
EcoRI+3 primer (50 ng/ul)	2	50ng
MseI+3 primer (50 ng/ul)	0.3	50ng
Taq polymerasa de Promega (5U/µl)	0.15	0.75U
DNA pre-amplificado	2	
H2O		Hasta 10 µl

## PROTOCOLO Nº 8

**Preparación de geles de poliacrilamida al 6% (geles desnaturalizantes), tomado y adaptado de los protocolos del CIMMYT 2006.**

### **a. Preparación de la solución de poliacrilamida**

En un Beacker se prepara la siguiente mezcla de acrilamida al 6%(cámara de extracción).

Filtrar la solución con ayuda de la bomba de vacío empleando un filtro desechable.

#### **Preparación de poliacrilamida al 6%**

<b>Reactivo stock</b>	<b>CC. Final</b>	<b>1L</b>
Urea	8M	422g
Archilamida: bisacrilamida	6%	100 ml (60g – 3g)
TBE 10X	0.5X	50ml
CC.Final		Hasta 1000ml

Rotular y conservar la solución a 4 °C en oscuridad.

### **b. Preparación de las placas de vidrio**

Las placas de vidrio son lavadas con detergente y luego enjuagada con agua desionizada (para eliminar posibles residuos del detergente). Una vez secas se limpia con etanol al 70 ó 96% y se deja durante 30 minutos a temperatura ambiente. Luego se procede al tratamiento independiente de cada placa de vidrio, en cámara de extracción de gases.

### **b.1. Preparación de vidrio pequeño con la solución adherente**

Una vez preparada la solución adherente, verter a la cara superior del vidrio donde se adherirá el gel, con ayuda de papel Kinwipes se cubre y expande la solución uniformemente dejando secar por 20 minutos.

Transcurrido el tiempo de secado se frotó con la ayuda de papel Kinwipes que fue usado inicialmente, en dirección perpendicular a la primera, para eliminar el exceso de la solución adherente (esto es importante para evitar que la solución adherente contamine la placa grande, lo cual podría ocasionar que el gel se rasgue al momento de separar los soportes de la corrida electroforética).

#### Solución adherente

<b>Reactivo</b>	<b>Volumen</b>
Bind Silano (adherente)	5 $\mu$
Acido acético Glacial	5 $\mu$ L
Etanol (96%)	1.5mL

### **b.2. Preparación del vidrio grande con la solución repelente**

Antes de preparar la placa de vidrio grande de la cámara es importante cambiar de guantes para evitar contaminar la placa con la solución adherente.

La cara superior de la placa de la cámara se limpio y luego se trata con 500  $\mu$ L de dimetilclorosilano, con la ayuda del papel Kinwipes se frotó en misma dirección la solución, cubriendo uniformemente la placa dejándolo secar por 10 min., trascurrido el tiempo de secado se retiraron los excesos de la solución repelente con papel Kinwipes, ya que los excesos de este puede causar inhibición de la tinción del gel.

### **c. Preparación de las placas de vidrio con el gel de poliacrilamida**

Limpiar los separadores y peines de los vidrios con etanol al 96%.

Colocar sobre los costados de la cara tratada del vidrio pequeño los espaciadores, luego se coloca el vidrio grande evitando el contacto con el vidrio pequeño de tal forma que queden ambas superficies tratadas uno frente al otro. Luego se colocan ganchos a los bordes y a la vez con cinta adhesiva para evitar derramar el gel poliacrilamida al momento de cargado.

#### d. Preparación del gel de poliacrilamida

1. Prepara la siguiente mezcla:

Reactivo	CC. Final	60mL
Sol. Poliacrilamida	6%	60mL
TEMED	6%	36 $\mu$ L
Persulfato de amonio (APS)	10%	360 $\mu$ L

Persulfato de Amonio (APS 10%):

Reactivo	CC. Final	1mL
APS	10%	0.1mg
H <sub>2</sub> O Mili- Q		hasta 1mL

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



#### **d.1. Pre – corrida del gel de poliacrilamida**

1. Retirar la cinta adhesiva y lavar el vidrio con agua mili Q las caras externas de los vidrios.
2. Retira el peine.
3. Colocar la cámara sobre la cubeta (ánodo) o llenarla de tampón de corrida TBE 0.5X.
4. Conectar la cámara (cátodo) a la fuente de poder (1600V) por 30 minutos.
5. Seguidamente detener la fuente de poder y limpiar el frente de corrida de restos de urea, poliacrilamida y burbujas.
6. Colocar el peine con los dientes hacia abajo para formar los pocillos donde serán cargadas las muestras.

## PROTOCOLO N° 9

### Protocolo de la electroforesis en poliacrilamida, tomado y adaptado del CIMMYT2006

1. Simultáneamente cuando el gel esta pre- corriendo, a cada una de las reacciones de amplificación agregar EL 50% (del volumen amplificado) de tampón de 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 terminada la pre – corrida, cargar con una micropipeta 5µl de cada muestra de ADN (amplicones) en cada uno de los pozos 8 creados por el peine) del gel de poliacrilamida.
5. Servir en los pozos del medio y extremos de 3.5µL del ADN ladder. Para identificar el tamaño de los productos de PCR, utilizar un patrón de peso molecular 10pb DNA ladder, que tiene un rango de lectura de 130 a 70pb.
6. Realizar la electroforesis durante 4 horas a 1600V o 16 horas a 450v, aproximadamente (hasta que el tampón de carga esté a la altura de las perillas de la cámara).

#### Stock DyE:

Reactivo	1ml
Xilencianol	50 mg
azul de Bromofenol	50mg
H <sub>2</sub> O Mili- Q	1 mi

Tampón de Carga:

<b>Reactivo</b>	<b>CC.Final</b>	<b>10mL</b>
Formamida	1 M	9.6 mL
EDTA0.2 M	0.2M	300 $\mu$ L
Stock DyE		100 $\mu$ L

10pb DNA Ladder ( 1:8)

<b>Reactivo</b>	<b>1ml</b>
H <sub>2</sub> O Mili- Q	5 $\mu$ L
DyE	40 $\mu$ L

## PROTOCOLO Nº 10

**Tinción y revelado de geles de poliacrilamida, tomado y adaptado de los protocolos de Biología Molecular del CIMMYT 2006.**

### **a. Fijación del Gel.**

Terminada la electroforesis se desmonta el equipo y se separan los vidrios empleando una espátula teniendo cuidado de no tocar el vidrio pequeño que contiene el gel adherido, el cual se coloca en una bandeja conteniendo la solución de fijación y se agita durante 30 minutos.

#### Solución de fijación

<b>Reactivo</b>	<b>1L</b>
Etanol absoluto	100mL
Acido Acético Glacial puro	5mL
H <sub>2</sub> Od.	Hasta 1L

### **b. Tinción de Gel.**

Terminado el tiempo de fijación se transfiere el gel a otra bandeja conteniendo la solución de tinción y durante 30 minutos se mantiene en agitación constante.

#### Solución de tinción:

<b>Reactivo</b>	<b>1L</b>
Nitrato plata ( AgNO <sub>3</sub> )	2g
H <sub>2</sub> Od.	1000mL

(\*)Tener las precauciones necesarias para el trabajo con nitrato de plata por ser un agente corrosivo oxidante.

### c. Revelado del Gel.

Posteriormente se observaron los productos de PCR en la solución de revelado, manteniendo en agitación hasta la visualización de las bandas.

Para detener la reacción de la solución reveladora se colocó el gel en la solución de fijación durante 10 a 15 minutos finalmente se hace la parada con ácido acético, puede ser la solución de la fijación rehusada. Luego enjuagar por 3 minutos aproximadamente con agua corriente y dejar secar.

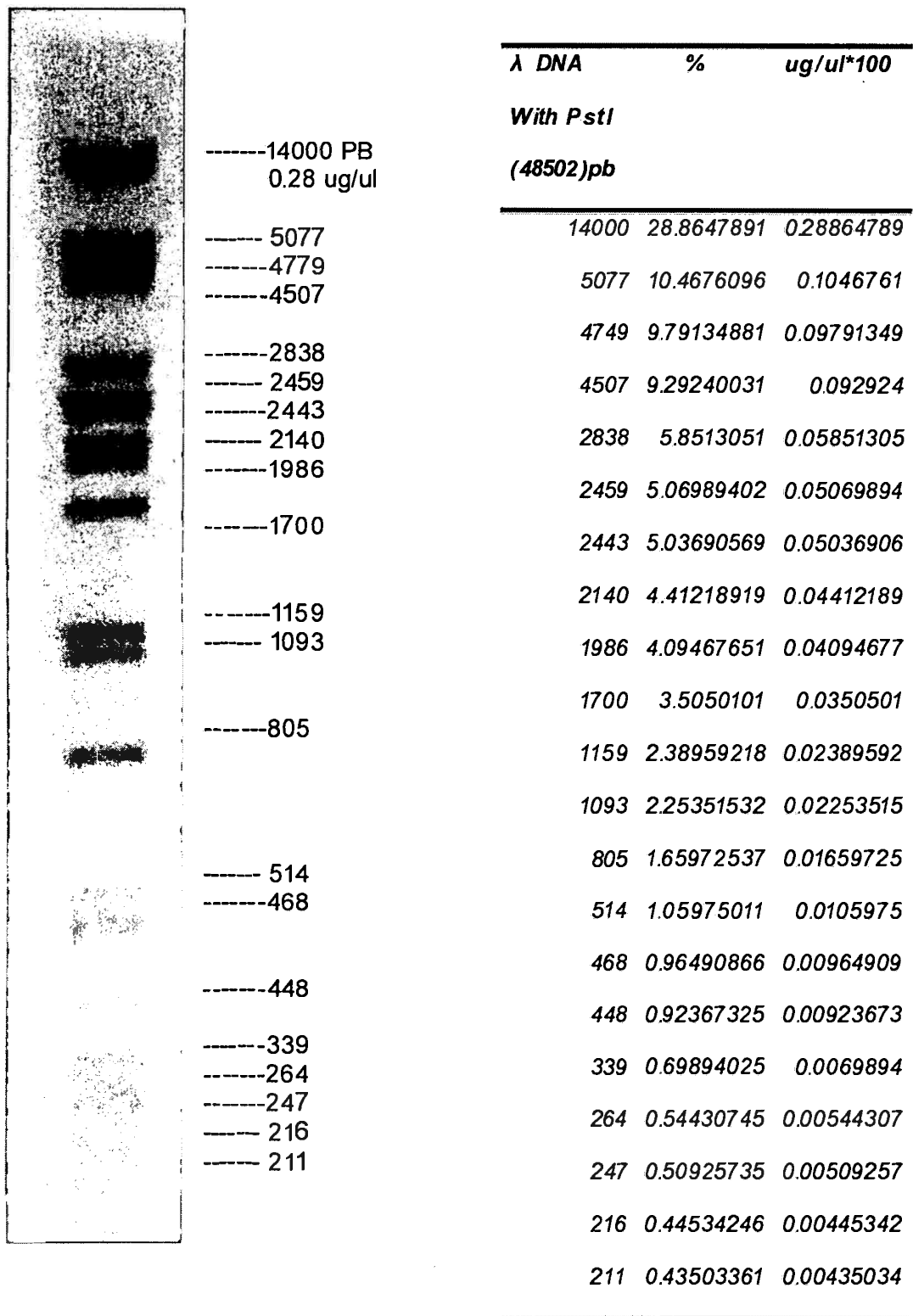
#### Solución de revelado:

Reactivo	1L
NaOH	30g
H <sub>2</sub> O d.	100mL
Formaldehido 37%	5mL

El formaldehido es cancerígeno; además causa lagrimeo y es inflamable

### d. Secado del Gel.

Se dejó secar el gel a temperatura ambiente, luego se procedió al fotografiado y/o escaneado para de esta manera tener el registro de marcadores AFLP encontrados.



**FIGURA Nº 15.** ADN lambda digerido con PSTI (48502)  
 Fuente: I Congreso peruano de mejoramiento genético UNALM 2010

**Foto N° 1.** Amplificación de los fragmentos de ADN en el termociclador.  
Laboratorio de Biología Molecular INIA-Lima, 2010



**Foto N° 2.** Evaluación de la calidad y cantidad de ADN en el fotodocumentador Chemidoc (BIO RAD). Laboratorio de Biología Molecular INIA-Lima, 2010.



## GLOSARIO

**Accesiones.** Las variedades nativas cuya semilla se colecta y se mantiene en bancos de germoplasma, debidamente identificadas con su información de origen y localización geográfica (pasaporte) se denominan "accesiones".

**Alelo.** (Genét.)Cada una de las formas alternativas de un gen situado en un locus de un determinado cromosoma.

**Carácter.-** Cualquier propiedad o evidencia taxonómica que varia entre las entidades estudiadas o descritas. Ejemplo: Forma de las alas del tallo.

**Ecotipo** Es el producto de la adaptación de una especie a un ambiente particular.

Ecotipo no es sinónimo de raza. Una raza puede habitar varios ambientes y su área de adaptación puede ser muy amplia.

**Especie.** Unidad fundamental de la sistemática de los organismos vivos. Conjunto de individuos con caracteres comunes transmisibles por herencia, interfértiles pero aislados genéticamente por barreras generalmente sexuales de las restantes especies, con un género de vida común y una distribución geográfica precisa. Se designa por el nombre genérico (en mayúscula) y el específico (en minúscula), seguidos de una abreviatura del nombre del autor o autores de la descripción válida de la especie.

**Germoplasma Vegetal.** El término «germoplasma» de una especie vegetal cultivada incluye: a) cultivares nativos de la especie; b) cultivares mejorados; c) poblaciones en proceso de mejoramiento; d) especies silvestres relacionadas, y e) especies cultivadas relacionadas.



**Homocigoto.** Individuo u organismo con alelos idénticos en un locus dado.

**Locus.** Un sitio o posición en un cromosoma.lugar cromosómico que en los organismos diploides puede ser ocupado como máximo por un par de alelos distintos, uno paterno y otro materno. Loci designa el plural de locus

**Kilobase (Kb).** Múltiplo de la unidad de longitud del ADN equivalente a mil bases.

**Marcadores moleculares.** (Genét.) Secuencias obtenidas de cualquier base de datos molecular capaces de manifestar un polimorfismo entre dos organismos que están siendo comparados.

**Morfotipo.** En las plantas agámicas o de reproducción vegetativa, se usa el morfotipo para diferenciar poblaciones e individuos. Un morfotipo está definido por una serie de características, principalmente morfológicas.

Un morfotipo está formado por plantas que son similares morfológicamente; muestran el mismo fenotipo pero no necesariamente son de la misma constitución genética.

**Polimorfismo.** (Genét.) La presencia en una misma población de dos o más formas distintas. Nota: dichas frecuencias se produce en frecuencias demasiado elevadas para que pueda explicarse por mutación recurrente.

**Variedades Nativas.** En general, las variedades recolectadas en regiones donde el cultivo se originó o diversificó, se denominan variedades nativas o autóctonas o tradicionales, o sea aquellas variedades que usan los agricultores tradicionalmente, y que no han pasado por ningún proceso de mejoramiento sistemático y científicamente controlado, y cuya semilla es producida por los mismos agricultores.

**Valores o Datos.-** Valor registrado que codifica el estado de un carácter.

Ejemplo: Cada uno de los valores: 0, 1, 2 o 3 que describen una de las diferentes Formas de las alas del tallo.

*Fuente: Manual para caracterización in situ de cultivos nativos Conceptos y Procedimientos Instituto Nacional de Investigación y Extensión Agraria, Lima 2006.*

## ABREVIATURAS

<b>µg</b>	Microgramo
<b>µL</b>	Microlitro
<b>µMol</b>	Micromol
<b>ADN</b>	Ácido Desoxirribonucleico
<b>AFLP</b>	Amplified fragment length polymorphism (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados)
<b>APS</b>	Persulfato de Amonio
<b>ARN</b>	Ácido Ribonucleico
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>BSA</b>	Albúmina de Suero Bovino
<b>CIMMYT</b>	Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y trigo
<b>CIP</b>	Centro Internacional de la Papa
<b>CONCYTEC</b>	Concejo Nacional de Ciencia, Tecnología e innovación Tecnológica
<b>CTAB</b>	Cetyl Trimethyl ammonium Bromide
<b>dNTPs</b>	Desoxirribonucleótidos
<b>EDTA</b>	Di-sodio Etilendiaminotetra-acetato.2H <sub>2</sub> O
<b>g</b>	Gramos
<b>H<sub>2</sub>O dd.</b>	Agua bidestilada
<b>IBT</b>	Instituto de Biotecnología, Lima, Perú
<b>INIA</b>	Instituto Nacional de Investigacion Agraria
<b>Kb</b>	Kilobase
<b>M</b>	Molar
<b>MBD</b>	Matriz Básica de Datos
<b>mg</b>	Miligramos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimolar
<b>MMx</b>	Master Mix

<b>m.s.n.m</b>	Metros sobre el nivel del mar
<b>ng</b>	Nanogramo
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PCR</b>	Polimerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
<b>PIC</b>	Polymorphism Index Content (Índice del Contenido Polimórfico)
<b>PVP</b>	Polyvinilpirrolidone (Poli vinil pirrolidona)
<b>RFLP</b>	Restriction Fragments Length Polymorphism Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>SAHN</b>	Sequential Agglomerative hierarchical Nested Cluster Analysis (Secuencial Aglomerativo Jerárquico Análisis Agrupamientos)
<b>SM</b>	Simple Matching (concordancia Simple)
<b>T4 ADN ligasa</b>	ADN ligasa del Bacteriófago T4
<b>T4 ADN</b>	ADN polimerasa del Bacteriófago T4
<b>Taq polimerasa</b>	Thermus aquaticus ADN polimerasa
<b>TBE</b>	Tampón Tris-Borato-EDTA
<b>UNALM</b>	Universidad Nacional Agraria La Molina
<b>U</b>	Unidad enzimática
<b>UNSCH</b>	Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Ayacucho

## MATRIZ DE CONSISTENCIA

Título	Problema	Objetivos	Marco teórico	Variable	Metodología
<p>Análisis de la diversidad genética de <i>Solanumsp.</i> "papas nativas" mediante Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP) del distrito de Chungui, provincia La Mar - Ayacucho. 2009-2010.</p>	<p>Históricamente los cultivares de papa han sido discriminados e identificados a través del uso de varias características morfológicas como son: el tipo de tubérculo, tipo de hoja, color de la flor, apariencia del brote, tipo de crecimiento y el comportamiento ante enfermedades; sin embargo, muchos de estos caracteres pueden variar drásticamente con las condiciones ambientales, por lo que en muchos casos el efecto del ambiente enmascara el efecto producido por los genes, de manera que el fenotipo no representa el potencial genético real de la planta. Por las consideraciones señaladas, el presente estudio pretende contribuir en determinar la utilidad de la técnica AFLP para el análisis de la diversidad en <i>Solanumsp.</i> "papas nativas" del distrito de Chungui de la provincia de La Mar del departamento de Ayacucho 2009 - 2010</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>General:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>Analizar la diversidad genética de <i>Solanumsp.</i> "papas nativas" mediante el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) de Chungui de la provincia La Mar del departamento de Ayacucho</li> </ul> </li> <li>• <b>Específicos:</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Determinar la combinación de iniciadores para el análisis de la diversidad genética de papas nativas.</li> <li>➤ Determinar el índice de correlación cofenética del análisis de agrupamiento genético.</li> <li>➤ Determinar la existencia o no de morfortipos duplicados de papas nativas.</li> <li>➤ Determinar los grupos genéticos de papas nativas.</li> </ul> </li> </ul>	<p><b>Papa nativa</b> La papa nativa es fruto del proceso de domesticación, selección y conservación realizado por los antiguos habitantes andinos. Las papas nativas crecen en los andes, especialmente en Perú y Bolivia, en alturas que fluctúan entre los 3 000 a 4 000 msnm., sus requerimientos de suelos son muy específicos.</p> <p><b>Marcadores Moleculares</b> Un marcador molecular es un sitio en el que hay heterocigosis para algún tipo de variación neutra en el ADN; esto es, que no está asociada a ninguna variación fenotípica observable.</p> <p><b>Análisis de la diversidad genética empleando el polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)</b> Esta técnica fue desarrollada en 1993 por la compañía privada Keygen, poseedora de la patente (Vos, 1995). Este nuevo marcador molecular detecta presencia o ausencia de los fragmentos de restricción más que diferencias de longitud. Pasos del AFLP: digestión, ligación pre amplificación y amplificación selectiva</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Papa nativa</li> <li>➤ Marcadores Moleculares AFLP</li> </ul>	<p><b>Tipo de Investigación</b> Básico descriptivo casi experimental</p> <p><b>Población</b> Las papas nativas del distrito de Chungui de la Provincia La Mar del departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Muestra</b> 25 morfortipos de papas nativas.</p> <p><b>Metodología</b> <b>Colecta de muestras</b> colectados en el mes de junio del 2009 en la localidad de Unión Libertad del distrito de Chungui (3290 a 3868 msnm), provincia La Mar del departamento de Ayacucho.</p> <p><b>Extracción de ADN</b> Se empleó el método CTAB (CIP, 1997) modificado, para lo cual se tomaron las hojas y tallos de las plántulas del cultivo <i>in vitro</i>.</p> <p><b>Técnica de AFLP</b> antes de empezar la técnica de aflp con todos los morfortipos, se realizó una prueba con muestras de ADN de 4 morfortipos de papas nativas lo cual permitió evaluar las condiciones óptimas para el desarrollo de la técnica.</p>

## ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

RD N° 209-2011-FCB-D

**Bach. Juan Carlos Gonzales Mamani**

En la ciudad de Ayacucho siendo las doce del medio día del día jueves once del mes de agosto del dos mil once, en el auditorio de la Facultad de Ciencias Biológicas reunidos para recepcionar el acto de sustentación de tesis bajo la presidencia del Dr. Víctor H. Alegría Valeriano en condición de Decano (e) de la facultad de ciencias biológicas y como miembro del jurado al Mg. Martín Tenorio Bautista, Blgo Yuret Miranda Tomasevich, Mg. Paula García Godos Alcázar y al Mg. Gilmar Peña Rojas y asistiendo como secretaria docente encargada la Mg. Paula García Godos Alcázar para recepcionar el acta de sustentación de tesis titulada: Análisis de la diversidad genética de *solanum* sp. "papas nativas" mediante polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP) del distrito de Chungui, provincia La Mar – Ayacucho. 2009-2010. presentado por el Bach. Juan Carlos Gonzales Mamani quien pretende optar el título profesional de biólogo con mención en microbiología.

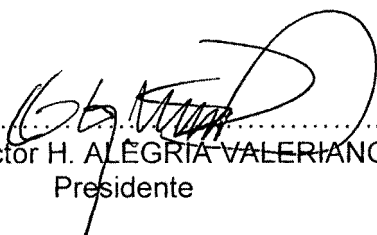
El decano inicia el acta de sustentación de tesis, solicitando a la secretaria docente (e) la revisión y la lectura de los documentos en mesa, luego invita al sustentante a la exposición del trabajo de investigación en un tiempo no mayor de cuarenta y cinco minutos. Concluida la exposición el decano (e) invitó al sustentante y a los jurados al paso a la segunda etapa donde los miembros del jurado participan realizando observaciones al informe y exposición, así como las preguntas y aclaraciones que consideren conveniente para calificar las calificaciones respectivas.

Culminada esta etapa el decano(e) invitó al sustentante y público asistente para que abandonen el auditorio a fin de que el jurado delibere y emita la evaluación correspondiente el cual es como sigue:

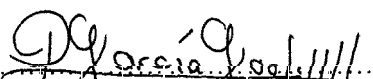
JURADO CALIFICADOR	Exposición	Rpta. Preg.	Promedio
Mg. Martín TENORIO BAUTISTA	18	18	18
Blgo. Yuret MIRANDA TOMASEVICH	17	17	17
Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR	14	14	14
Mg. Gilmar PEÑA ROJAS	19	18	19

**PROMEDIO: 17**


De la evaluación realizada el sustentante obtiene la calificación promedio de diecisiete de la cual dan fe los miembros del jurado calificador estampando su firma al pie de la presente. Culmina el acta de sustentación siendo dos y veinticinco de la tarde

  
.....  
Dr. Víctor H. ALEGRIA VALERIANO  
Presidente

  
.....  
Mg. Martín TENORIO BAUTISTA  
Miembro Jurado

  
.....  
Mg. Paula GARCÍA GODOS ALCÁZAR  
Miembro Jurado Secret (e)

  
.....  
Blgo. Yuret MIRANDA TOMASEVICH  
Miembro Jurado

  
.....  
Mg. Gilmar PEÑA ROJAS  
Miembro Jurado - Asesor