

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN CRISTOBAL
DE HUAMANGA**

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA DE FORMACION PROFESIONAL DE AGRONOMIA



**DIVERSIDAD GENETICA DE PASTOS NATIVOS, MEDIANTE AFLP, EN OCHO
ZONAS ALTOANDINAS DE AYACUCHO Y HUANCAYELICA**

Tesis para obtener el título profesional de:

Ingeniero Agrónomo

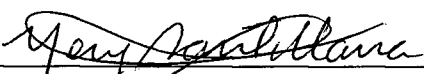
Presentado por:

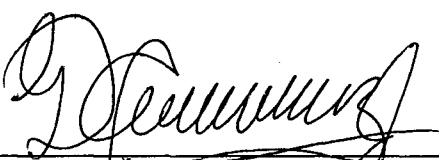
Alejandro García Noa

**AYACUCHO - PERU
2010**

**“DIVERSIDAD GENÉTICA DE PASTOS NATIVOS, MEDIANTE AFLP, EN
OCHO ZONAS ALTOANDINAS DE AYACUCHO Y HUANCAMELICA”**

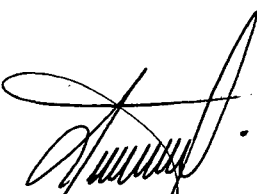
Recomendado : 16 de agosto de 2010
Aprobado : 09 de setiembre de 2010


DRA. NERY LUZ SANTILLANA VILLANUEVA
Presidente del Jurado


M.Sc. ING. GERMAN FERNANDO DE LA CRUZ LAPA
Miembro del Jurado


M.Sc. ING. JOSÉ ANTONIO QUISPE TENORIO
Miembro del Jurado


ING. WILFREDO DANIEL GÓNZALES GUZMÁN
Miembro del Jurado


M.Sc. ING. RAÚL JOSÉ PALOMINO MARCATOMA
Decano de la Facultad de Ciencias Agrarias

El presente trabajo de Tesis “Diversidad Genética de Pastos Nativos, Mediante AFLP, en Ocho Zonas Altoandinas de Ayacucho y Huancavelica”, ha sido realizado en el Laboratorio de Biología Molecular de la Sub Dirección de Recursos Genéticos y Biotecnología (SUDIRGEB) del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental La Molina (Sede Central-Lima); para el Sub Proyecto del PNI de Pastos y Forrajes “Caracterización, Multiplicación y Conservación de las Principales Especies Deseables de la Pradera Nativa Altoandina”, de la Estación Experimental Agraria Canaán-INIA (Ayacucho) en Cofinanciamiento a través del Fondo de Desarrollo de Servicios Estratégicos del Programa INCAGRO.

Esta obra está dirigida a mis padres Alejandro y Leonor Bibiana por su importante rol en mi formación como persona y luego profesionalmente, quienes siempre estaban presentes cuando más los necesitaba.

A María Soledad, por su apoyo constante e incondicional para la culminación de esta obra.

A mis hermanos: Flor de María, Mercedes, Marisol y Alfredo, por su apoyo moral en mi formación profesional.

AGRADECIMIENTOS

- ❖ A la Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga, Facultad de Ciencias Agrarias, Escuela de Formación Profesional de Agronomía, por impartirme una formación integral como Ingeniero Agrónomo para el desarrollo de las actividades agropecuarias.
- ❖ Al Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA); Estación Experimental Agraria Canaán-Ayacucho y La Molina-Lima, por la oportunidad brindada en la ejecución del presente trabajo y por las facilidades brindadas para el acceso al Laboratorio de Biología Molecular.
- ❖ Al Ing. MSc. Godofredo Mamani Mamani, Coordinador del Programa de Innovación de Pastos y Forrajes, responsable en la obtención de financiamiento para la ejecución del presente trabajo.
- ❖ Al Ing. MSc. Germán de La Cruz Lapa (Asesor), Ing. MSc. José Quispe Tenorio (Coasesor) y PhD. Nery Villanueva Santillana por sus ideas alentadoras y motivadoras en la elaboración del presente trabajo. Y a mis profesores de la Facultad por impartir y compartir sus conocimientos y experiencias que han contribuido en mi formación profesional.
- ❖ A la Blga. Yeny Natali Aquino Villasante, Blgo. Fernando Rimachi Gamarra, Ing. Eudosio Veli Rivera, Blga. Rocio del Carmen Silvestre de las Casas, de quienes recibí instrucciones de genética molecular.
- ❖ Y a todas las personas por su apoyo constante, incondicional y desinteresado en la culminación de este trabajo.

INDICE GENERAL

Pág.

CARATULA

RECONOCIMIENTO

DEDICATORIA

AGRADECIMIENTO

RESUMEN

INTRODUCCION

CAPITULO I: REVISION DE LITERATURA

1.1. Pastizales de las zonas altoandinas	1
1.2. Taxonomía y morfología de las especies forrajeras nativas	3
1.2.1. Taxonomía	3
1.2.2. Morfología	3
1.3. Distribución de las praderas nativas	6
1.4. Diversidad en la comunidad vegetal de Puna	7
1.5. Marcadores moleculares	10
1.5.1. Proteína de reserva en semillas	10
1.5.2. Isoenzimas	11
1.5.3. Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD)	12
1.5.4. Secuencias sencillas repetidas (SSR)	13
1.5.5. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)	14
1.5.6. Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP)	15
a. Base genética y detección de marcadores AFLP	15
b. Ventajas de los marcadores AFLP	19
c. Limitaciones de los marcadores AFLP	19

1.5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	20
1.6. Análisis de diversidad genética con uso marcadores moleculares	21
1.6.1. Análisis básico de diversidad genética	22
1.6.2. Proporción de loci polimórfico	23
1.6.3. Heterocigosidad promedio esperada (H_e) (diversidad genética de Nei)	23
1.6.4. Índice de similitud y disimilitud	24
1.6.5. Árboles de distancia genética	26
1.6.6. Coeficiente de correlación cofenética (r)	27
1.6.7. Bootstrap	28
1.6.8. Distribución geográfica	28

CAPITULO II: MATERIALES Y METODOS

2.1. Ubicación y caracterización del área de trabajo	29
2.1.1. Ubicación geográfica y política de los pastizales	29
a. Composición florística de los pastizales	30
b. Características de suelo de los pastizales	32
c. Características del clima de los pastizales	32
2.1.2. Ubicación geográfica y política del laboratorio molecular	34
2.2. Descripción de materiales	34
2.2.1. Material biológico	34
2.2.2. Materiales e insumos en general	34
2.3. Metodología de obtención de muestras en campo	36
2.3.1. Identificación de especies y selección de zonas de recolección	36
2.3.2. Recolección de muestras	36
2.3.3. Preparación de muestras para su traslado	37

2.4. Trasplante de colectas de especies forrajeras nativas	38
2.5. Identificación de marcadores AFLP	40
2.5.1. Extracción de ADN de especies forrajeras nativas	40
2.5.2. Evaluación del ADN aislado	43
2.5.3. Amplificación de fragmentos AFLP	46
a. Digestión	48
b. Ligación	49
c. Preselectiva	49
d. Selectiva	51
2.5.4. Electroforesis de los productos de amplificación	54
a. Preparación del gel de poliacrilamida	54
b. Instalación y pre electroforesis del gel	55
c. Denaturación	55
d. Cargado y corrida electroforética de la muestra	56
2.5.5. Tinción del gel de poliacrilamida para revelar bandas amplificadas	56
a. Fijación	56
b. Lavado post fijación	56
c. Impregnación de la plata	57
d. Lavado post impregnación	57
e. Revelado	57
2.5.6. Registro de marcadores AFLP	58
2.6. Análisis de diversidad genética	58
2.6.1. Riqueza de marcadores AFLP	60
2.6.2. Proporción de loci polimórfico (P)	60
2.6.3. Diversidad genética de Nei (h)	60
2.6.4. Similitud genética (coeficiente de similitud Jaccard)	61

a. Correlación	61
b. Reproducibilidad (bootstrap)	61
2.7. Análisis y distribución espacial de datos	62

CAPITULO III: RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Diversidad genética de las especies forrajeras nativas altoandinas	63
3.1.1. Riqueza de Marcadores Moleculares AFLP	63
3.2. Diversidad genética de la especie forrajera <i>Festuca dolichophylla</i>	66
3.2.1. Diversidad genética intrapoblacional	66
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población	66
b. Diversidad genética en la población	67
3.2.2. Diversidad genética interpoblacional	67
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP entre poblaciones	67
b. Marcadores exclusivos	67
c. Diversidad genética entre las poblaciones	70
3.2.3. Análisis de distancia genética	70
a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)	71
b. Análisis de Agrupamiento UPGMA	71
c. Coeficiente de Correlación (r)	73
d. Reproducibilidad	73
3.2.4. Distribución geográfica	76
a. Riqueza de grupos	76
b. Distancia genética	76
3.3. Diversidad genética de la especie forrajera <i>Poa perligulata</i>	79
3.3.1. Diversidad genética intrapoblacional	79
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población	79

b. Diversidad genética en la población	80
3.3.2. Diversidad genética interpoblacional	80
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP	80
b. Marcadores exclusivos	80
c. Diversidad genética entre las poblaciones	82
3.3.3. Análisis de distancia genética	83
a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)	83
b. Análisis de Agrupamiento UPGMA	84
c. Coeficiente de Correlación (r)	86
d. Reproducibilidad	86
3.3.4. Distribución geográfica	89
a. Riqueza de grupos	89
b. Distancia genética	89
3.4. Diversidad genética de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i>	92
3.4.1. Diversidad genética intrapoblacional	92
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población	92
b. Diversidad genética en la población	92
3.4.2. Diversidad genética interpoblacional	93
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP	93
b. Marcadores exclusivas	94
c. Diversidad genética entre las poblaciones	95
3.4.3. Análisis de distancia genética	96
a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)	97
b. Análisis de Agrupamiento UPGMA	97
c. Coeficiente de Correlación (r)	99
d. Reproducibilidad	100

3.4.4. Distribución geográfica	103
a. Riqueza de grupos	103
b. Distancia genética	103
3.5. Diversidad genética de la especie forrajera <i>Trifolium amabile</i>	106
3.5.1. Diversidad genética intrapoblacional	106
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población	106
b. Diversidad genética en la población	107
3.5.2. Diversidad genética interpoblacional	107
a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP	107
b. Marcadores exclusivas	107
c. Diversidad genética entre las poblaciones	109
3.5.3. Análisis de distancia genética	110
a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)	110
b. Análisis de Agrupamiento UPGMA	111
c. Coeficiente de Correlación (r)	113
d. Reproducibilidad	113
3.5.4. Distribución geográfica	116
a. Riqueza de grupos	116
b. Distancia genética	116
 <u>CAPITULO IV: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</u>	
4.1. Conclusiones	124
4.2. Recomendaciones	126
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	127
ANEXOS	134

LISTA DE TABLAS

Tabla	Pág.
1-1 Clasificación taxonómica de las especies forrajeras nativas altoandinas.	3
2-1 Ubicación Geográfica y Política de las zonas de recolección de pastos nativos.	30
2-2 Análisis físico-químicos de los suelos de los pastizales nativos altos andinos.	32
2-3 Temperaturas medias y precipitación mensual (2007) de la estación meteorológica Apacheta (4150 msnm).	33
2-4 Relación de muestras colectadas y analizadas por especies, zonas ecológicas y sitios (A, B y C) de los pastizales nativos altoandinos.	35
2-5 Iniciadores seleccionados con base a las secuencias de <i>EcoRI</i> y <i>MseI</i> , para la amplificación de marcadores AFLP de las especies de pastos nativos altoandinos.	47
2-6 Protocolo del proceso de digestión del ADN genómico de las especies forrajeras nativas con enzimas de restricción (<i>EcoRI</i> / <i>MseI</i>).	48
2-7 Protocolo del proceso de ligación de adaptadores (<i>Eco</i> / <i>Mse</i>) para muestras de ADN-digerido de las especies forrajeras nativas.	49
2-8 Protocolo del proceso de amplificación preselectiva para muestras de ADN digerido-ligado de las especies forrajeras nativas, con primers (<i>Eco</i> 00/ <i>Mse</i> 00).	50
2-9 Programa de amplificación preselectiva para marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.	50

2-10	Protocolo del proceso de amplificación selectiva para muestras de ADN de la preselectiva diluida de las especies forrajeras nativas, con la combinación de iniciadores o primers seleccionados.	52
2-11	Programa de amplificación selectiva para marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.	52
2-12	Combinación de iniciadores para la amplificación de marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.	53
3-1	Marcadores AFLP detectados en la población de pastos nativos alto andinos.	64
3-2	Marcadores AFLP polimórficas detectadas en las especies forrajeras nativas altoandinas por combinación de iniciadores.	64
3-3	Marcadores AFLP monomórficos detectados en las especies forrajeras nativas altoandinas por combinación de iniciadores.	65
3-4	Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie <i>Festuca dolichophylla</i> con 6 combinaciones de iniciadores.	66
3-5	Diversidad genética en la población de la especie <i>Festuca dolichophylla</i>	67
3-6	Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas alto andinas, de la especie <i>Festuca dolichophylla</i> .	68
3-7	Marcadores exclusivos y sus frecuencias de las poblaciones por zonas ecológicas de la especie <i>Festuca dolichophylla</i> .	69
3-8	Indices de similitud genética con el coeficiente de Jaccard (J), de la especie <i>Festuca dolichophylla</i> .	71

3-9	Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie <i>Festuca dolichophylla</i> .	72
3-10	Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie <i>Poa perligulata</i> con 6 combinaciones de iniciadores.	79
3-11	Diversidad genética en la población de la especie <i>Poa perligulata</i> .	80
3-12	Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas alto andinas, de la especie <i>Poa perligulata</i> .	81
3-13	Marcadores exclusivos y sus frecuencias de las poblaciones por zonas ecológicas de la especie <i>Poa perligulata</i> .	82
3-14	Indices de similitud genética con el coeficiente de Jaccard (J), de la especie <i>Poa perligulata</i> .	84
3-15	Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie <i>Poa perligulata</i> .	85
3-16	Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> con 6 combinaciones de iniciadores.	93
3-17	Diversidad genética en la población de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	93
3-18	Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas alto andinas, de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	94
3-19	Marcadores exclusivos y sus frecuencias de las poblaciones por zonas ecológicas de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	96
3-20	Indices de similitud genética con el coeficiente de Jaccard (J), de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	97

3-21	Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	99
3-22	Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie <i>Trifolium amabile</i> con 6 combinaciones de iniciadores.	106
3-23	Diversidad genética en la población de la especie <i>Trifolium amabile</i> .	107
3-24	Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas altoandinas, de la especie <i>Trifolium amabile</i> .	108
3-25	Marcadores exclusivos y sus frecuencias de las poblaciones por zonas ecológicas de la especie <i>Trifolium amabile</i> .	109
3-26	Índices de similitud genética con el coeficiente de Jaccard (J), de la especie <i>Trifolium amabile</i> .	111
3-27	Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie <i>Trifolium amabile</i> .	112

LISTA DE FIGURAS

Figura	Pág.
1-1 Análisis básico de la diversidad genética.	22
2-1 Diagrama ombrotérmica (T°C versus Pp mm) con datos de clima de la estación Apacheta, de los pastizales nativos altoandinos.	33
2-2 Especies forrajeras nativas altoandinas.	35
2-3 Recolección de plantas completas de pastos nativos altoandinos.	37
2-4 Recolección de especies forrajeras nativas, en la zona de Santa Inés. Sitios de recolección (A, B y C). N° de plantas (P1 y P2).	37
2-5 Muestras de pastos nativos preparados para su traslado, con sus respectivos códigos de identificación.	38
2-6 Obtención de partes tiernas de pastos nativos altoandinos.	39
2-7 Diagrama esquemático del método de extracción de ADN genómico de las especies forrajeras altoandinas.	42
2-8 Método Qubit Fluorometer para cuantificar el ADN de las especies forrajeras nativas altoandinas.	45
2-9 Bandas de ADN (25 ng/μl) de las especies forrajeras nativas, evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. (λ) Lambda (56 ng).	46
2-10 Amplificación de fragmentos AFLP de pastos nativos altoandinos, mediante PCR.	53
2-11 Registro de datos de marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas altoandinas.	59

3-1	Representación esquemática de marcadores AFLP detectadas en las especies forrajeras nativas altoandinas.	65
3-2	Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Festuca dolichophylla</i> .	68
3-3	Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Festuca dolichophylla</i> .	70
3-4	Dendograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Festuca dolichophylla</i> .	74
3-5	Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Festuca dolichophylla</i> .	75
3-6	Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Poa perligulata</i> .	81
3-7	Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Poa perligulata</i> .	83
3-8	Dendograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Poa perligulata</i> .	87
3-9	Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Poa perligulata</i> .	88

3-10	Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Muhlenbergia ligularis</i>.	94
3-11	Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Muhlenbergia ligularis</i>.	96
3-12	Dendograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Muhlenbergia ligularis</i>.	101
3-13	Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Muhlenbergia ligularis</i>.	102
3-14	Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Trifolium amabile</i>.	108
3-15	Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa <i>Trifolium amabile</i>.	110
3-16	Dendograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa alto andina <i>Trifolium amabile</i>.	114
3-17	Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina <i>Trifolium amabile</i>.	115

LISTA DE MAPAS

Mapa	Pág.
1 Ubicación de las zonas de colecta.	31
2 Riqueza de grupos <i>Festuca dolichophylla</i> .	77
3 Distancia genética <i>Festuca dolichophylla</i> .	78
4 Riqueza de grupos <i>Poa perligulata</i> .	90
5 Distancia genética <i>Poa perligulata</i> .	91
6 Riqueza de grupos <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	104
7 Distancia genética <i>Muhlenbergia ligularis</i> .	105
8 Riqueza de grupos <i>Trifolium amabile</i> .	117
9 Distancia genética <i>Trifolium amabile</i> .	118

LISTA DE ANEXOS

Anexo		Pág.
1	Datos de recolección de las 120 colectas de las 4 especies forrajeras nativas altoandinas.	134
2	Equipamiento en general.	138
3	Protocolo para la extracción de ADN genómico de las especies forrajeras nativas altoandinas, según el método CTAB (CIP, 1997), modificado en el laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB-INIA.	144
4	Electroforesis en gel de agarosa 1%, para evaluar el ADN aislado.	150
5	Preparación del gel de poliacrilamida.	153
6	Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%, para la separación de fragmentos.	155
7	Tinción del gel de poliacrilamida.	157
8	Soluciones para la extracción de ADN genómico.	159
9	Soluciones para la electroforesis en gel de agarosa 1%.	161
10	Soluciones para la electroforesis en gel de poliacrilamida.	162
11	Soluciones para la tinción de geles de poliacrilamida.	164

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la Longitud de Fragmento Amplificados)
CIP	Centro Internacional de la Papa
CTAB	Bromuro de Ceti-Trimetil-Amonio
EDTA	Etilen Diamine Tetra-Acetic acid (Ácido Etilen-Diamino-Tetra acético)
NTSYS	Numerical Taxonomic System (Sistema de Taxonomía Numérica)
Pb	Pares de Base
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PVP	Poli Vinil Pirrolidona
RAPD	Randon Amplified Polymorphism DNA (Polimorfismo en el ADN Amplificado Aleatoriamente)
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos de Restricción)
SSR	Simple Sequence Repeats (Secuencias Simples Repetidas)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetra-Metil Etilen di-amina
UPGMA	Unweighted pair group method using arithmetic averages (Método de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas)

RESUMEN

Los pastos poáceas (*Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata* y *Muhlenbergia ligularis*) y la leguminosa (*Trifolium amabile*), son especies forrajeras nativas perennes presentes en los pastizales de las zonas altoandinas de Ayacucho y Huancavelica, como en toda zona altoandina de la Región de los Andes Peruanos. De ellos, se recolectaron 30 individuos por cada especie para los análisis de diversidad genética.

Los estudios de diversidad genética, se realizaron en el Laboratorio de Biología Molecular de la INIA, mediante marcadores moleculares AFLP, para lo cual se seleccionaron 6 combinaciones de iniciadores, diseñados en base a las secuencias de *EcoRI* y *MseI*.

La diversidad genética se estimó a través de distancias genéticas utilizando el coeficiente de Jaccard, estableciéndose grupos funcionales

mediante análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA). Hubo 1100 bandas de marcadores AFLP, de las cuales 52.3% (575 bandas) fueron polimórficas. El número de fragmentos fue variable dependiendo de la especie, se obtuvo un mínimo de 93 bandas (*Trifolium amabile*) y un máximo de 202 (*Festuca dolichophylla*). Las mejores combinaciones de iniciadores fueron *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA, dado que reportaron el mayor número de bandas polimórficas, especialmente en las especies de la familia Poaceae. La diversidad genética promedios variaron de 0.241 (*Muhlenbergia ligularis*) a 0.341 (*Poa perligulata*). El análisis UPGMA estableció grupos que varió de 6 (*Poa perligulata*) a 11 (*Festuca dolichophylla*), basados en polimorfismo genético y el coeficiente de similitud Jaccard, con altos grados de confianza (de 5 a 100%) y que fueron consistentes con análisis de reproducibilidad (bootstrap) para probabilidades porcentuales de cada nodo del árbol resultante, con 2000 permutaciones.

Los análisis indicaron de medio a alto grado de diversidad genética en las especies forrajeras nativas poáceas. El alto número de marcadores AFLP exclusivos para las especies de pastos nativos altoandinos hace suponer que el flujo de genes es escaso y se pueden detectar en las zonas colectas que comparten características propias. En este estudio se ha obtenido información útil para su uso y conservación eficiente.

INTRODUCCION

Las grandes áreas de pastizales nativos de la zona altoandina comprenden gran cantidad de poblaciones de especies forrajeras. Representa la más importante y económica fuente de alimentación de la ganadería altoandina (50% en ovinos y vacunos; y 100% en los camélidos) de aproximadamente el 80% de la ganadería nacional (Rosemberg, 2000). En este pastizal nativo, últimamente, se está produciendo la disminución y desaparición de algunas de las especies más importantes que cubren las demandas nutricionales, como las del género festuca, poa, muhlenbergia, trifolium entre otras.

La investigación genética de estas especies forrajeras nativas es una alternativa para la solución de los problemas, porque los estudios de diversidad genética en plantas están relacionados a los caracteres

agronómicos y comerciales. La caracterización morfológica del germoplasma se basa fundamentalmente en características de alta y baja heredabilidad, medidas a través del fenotipo; sin embargo, las principales limitantes de esta caracterización son la influencia ambiental, el tiempo requerido para coleccionar los datos y el reducido número de genes involucrados. Mientras la caracterización molecular a través de ADN, obvia estos inconvenientes, porque un carácter, responde a un patrón único que es su composición hereditaria o genética de una especie.

Esta identidad genética es evidenciada a través de técnicas de biología molecular que permite analizar su ADN; significa, determinar la diversidad genética de una población de las especies forrajeras nativas de los pastizales altoandinos, mediante marcador molecular de Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP).

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de *loci* por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles (Karp *et al*, 1997). Por tanto, aportan información precisa de la variación genética de las especies forrajeras nativas.

La presente investigación, está dirigido directamente a analizar la **diversidad genética de pastos nativos de las especies *Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile***; recolectados en las zonas altoandinas de Ccarhuaccpampa, Hospicio, Huillcani, Quesera, Huaracco, Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuancho para el Subproyecto de "Caracterización, multiplicación y

conservación de las principales especies deseables de la pradera nativa altoandina”.

Motivo por el cual, se realizó el presente trabajo de investigación con los siguientes objetivos:

OBJETIVO GENERAL

Analizar la diversidad genética en las poblaciones de pastos nativos altoandinos entre los más importantes *Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile*; de Ayacucho (Ccarhuaccpampa y Hospicio) y Huancavelica (Huillcani, Quesera, Huaracco, Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuancho), mediante marcadores moleculares AFLP.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- ❖ Analizar la diversidad genética intrapoblacional de las especies de pastos nativos en ocho zonas ecológicas.
- ❖ Analizar la diversidad genética interpoblacional de las especies de pastos nativos entre ocho zonas ecológicas.
- ❖ Analizar la distribución espacial de la diversidad genética en base de grupos y similitud genética de las especies de pastos nativos.

CAPITULO I

REVISION DE LITERATURA

1.1. Pastizales de las zonas altoandinas

Flórez (2005), señala que los pastizales de las zonas altoandinas se encuentran entre los 3800 a 4400 msnm y están compuestas por una vegetación baja, cuya época de crecimiento coincide con la estación de lluvias, siendo la mayoría gramíneas perennes. A las gramíneas, se asocian otras hierbas, tanto anuales como perennes, los cuales, al finalizar la estación de lluvias (de crecimiento para todos los pastos), sigue la estación seca, en la que las hierbas más delicadas desaparecen y queda una vegetación compuesta principalmente por gramíneas. Por su parte Tovar y Oscanoa (2002), afirman dentro del conjunto de comunidades vegetales de

Puna, los pastizales de esta región, como en todo los andes, mayormente se encuentra constituido por especies de Gramíneas (Poáceas) y solamente una pequeña proporción está conformada por especies de otras familias, tales como las Juncáceas, Cyperáceas, Leguminosas y Compuestas.

Las gramíneas constituyen el mayor grupo de especies vegetales en estas praderas. Entre las especies principales se menciona: la “chilligua” (*Festuca dolichophylla*), el “crespillo” (*Calamagrostis vicunarum*), el “ichu” (*Stipa ichu*), el “llachu” o “chili” (*Muhlenbergia fastigiata*) y el “ccachu” (*Poa candamoana*). Entre las leguminosas se encuentran el “layo” (*Trifolium amabile*) y el “garbancillo” (*Astragalus garbancillo*), que es considerado tóxico para el ganado. Otras especies dentro de otros géneros de plantas son: “miski illi” (*Hipochaeris taraxacoides*), la “ojotilla wilalayo” (*Geranium sessiliflorum*-familia Geraniaceae), “cyperus” (familia Ciperaceae), y los “juncus” y “scirpus” (familia Juncaceae) (Flórez, 2005).

Además, los pastos naturales comprenden las áreas cubiertas por una vegetación herbácea, predominantemente de gramíneas, ciperáceas y rosáceas, y que varían en su composición fundamentalmente de acuerdo a la humedad del suelo, exposición y características edafológicas como textura y materia orgánica (Tapia y Flores, 1984).

1.2. Taxonomía y morfología de las especies forrajeras nativas

1.2.1. Taxonomía

La taxonomía de las especies forrajeras nativas, está basada en el sistema de clasificación filogenética de Adolph Engler publicado en la XII edición de syllabus del año 1954-1964 (Mostacero *et al*, 2002; Tovar, 1993) (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Clasificación taxonómica de las especies forrajeras nativas altoandinas.

Clasificación	Chilligua	Poa
Clase	Angiospermas	Angiospermas
SubClase	Monocotyledoneae	Monocotyledoneae
Orden	Poales	Poales
Familia	Poaceae	Poaceae
Sub familia	Festucoideae	Festucoideae
Tribu	Poeae	Poeae
Género	Festuca	Poa
Especie	<i>Festuca dolichophylla</i>	<i>Poa perligulata</i>

Clasificación	Atun-chiji	Layo
Clase	Angiospermas	Angiospermas
SubClase	Monocotyledoneae	Dicotyledoneae
Orden	Poales	Rosales
Familia	Poaceae	Fabaceae
Sub familia	Festucoideae	Papilionáceas
Tribu	Sporoboleae	Trifoliadeae
Género	Muhlenbergia	Trifolium
Especie	<i>Muhlenbergia ligularis</i>	<i>Trifolium amabile</i>

Fuente: Tovar (1993).

1.2.2. Morfología

Se consigna una breve descripción morfológica de cada una de las especies nativas altoandinas consideradas en el presente trabajo (Tovar, 1993; Tovar y Oscanoa, 2002).

Festuca dolichophylla Presl, Rel. Haenk 1:258 (1830)

N.V. "chilligua", "huaylla-ocsha". *Planta* perenne, amacollada, tallos que varía de 40-90 cm de altura, esto de acuerdo a la edad de la planta y la profundidad de los suelos donde se desarrollan. *Lígula* menor de 1 mm de largo, membranáceo, ciliado. *Laminas foliares* de 10-35 cm de largo, a veces sobrepasan al tallo y panícula, subrígidas, de ápice agudo o algo tubulado, involutas, la lámina superior de la caña algo aplanada, finamente pubescente en el haz, los pelos cortos y algo densos. *Panícula* de 9-16 cm de largo, con pedicelos glabrescentes. *Glumas* desiguales, agudas o subagudas, glabras, gluma inferior de 3-3.5 mm de largo y gluma superior de 3.8-5 mm de largo. *Lemma* inferior de 6-7 mm de largo, oblongo lanceolada, a veces ligeramente acuminadas o brevemente aristulada, finamente escabrosa hacia el ápice.

Hábitat en suelos algo secos, en pajonal de Puna. Distribuido en el territorio alto andino (Puna inferior), entre 3800-4500 msnm.

Poa perligulata Pilger, Notizbl. Not. Gart. Berlin 11:779 (1933)

Planta perenne, cespitosa, con cañas de 3.5-7 cm de altura. *Lígula* de 1-3.5 mm de largo, membranácea. *Laminas foliares* de 1-3 cm de largo, plegadas o a veces planas, algo suaves, agudas o subagudas, de ápice arqueado, glabras. *Panoja* de 2-2.5 cm de largo por 0.5-0.7 cm de ancho, más o menos de color bronceado, densa, espiciforme, aovada, ramas adpresas. *Espiguillas* 2-floras, de 4-4.5 mm de largo. *Glumas* ligeramente desiguales, glabras, obtusas o subagudas, la primera de 2.5-2.8 mm de

largo, la superior de 2.7-3 mm de largo. *Lemma* inferior de 3.7-4 mm de largo, subaguda u obtusa, membranácea pardusca hacia el ápice.

Hábitat en suelos húmedos, junto a las turberas de *Distichia* (oconales) de la Puna, o en estepa de gramíneas de suelos algo húmedos. Ampliamente difundida en el territorio alto andino de Perú y Bolivia, entre 4100-4650 msnm.

Muhlenbergia ligularis (Hackel) Hitchcock, Contr. U.S. Nat. Herb. 24(8):388

N.V. "atun-chiji", "grama blanca". *Planta* perenne, cespitosa, con cañas decumbentes o postradas, de 4-8 cm de largo. *Laminas* foliares planas o subinvolutas, de 1-2 cm de largo por 1-2 mm de ancho, suaves. *Panícula* pequeña negruzca, de 1.2-2 cm de largo, pauciflora, suelta o subapretada, ramas ascendente-adpresas. *Espiguilla* de 2 mm de largo. *Glumas* iguales, comúnmente de 1-1.3 mm de largo, de ápice obtuso o truncado. *Lemma* de 2 mm de largo, acuminado o agudo, glabro.

Hábitat en campos abiertos o entre pajonales de Puna, de suelos degradados. Distribuido en los andes centrales de Ecuador, Perú y Bolivia. En el Perú se encuentra entre los 3500-4300 msnm.

Trifolium amabile Humboldt., Bonpland. & Kunth

N.V. "trébol", "layo". *Planta* perenne de raíz pivotante algo engrosada bien desarrollada; *tallo* suberguido o procumbente; *hojas* compuestas trifolioladas, los foliolos anchamente aovados, redondeados en el ápice, con pedicelo de 2 mm de largo; *estipulas* acuminadas o mucronadas;

inflorescencia en umbela simple con 8-14 flores de color rosado-rojizo; *fruto* en vaina subglobosa, redondeado-elíptico, con 1 ó 2 semillas.

Hábitat en suelos algo secos o subhúmedos, en campos abiertos de la Puna. En el Perú se encuentra en la región mesoandina superior (entre 3400 y 3850 msnm) y la altoandina inferior (entre 3850 y 4500 msnm).

1.3. Distribución de las praderas nativas

La región andina o sierra del Perú está conformada por la cordillera de los Andes, que corre de sur a norte de nuestro territorio y está ubicada entre la costa y la selva. Su paisaje tiene una configuración heterogénea con cumbres nevadas, profundos cañones, estrechos valles interandinos y amplias mesetas o altiplanicies.

En la sierra las praderas alto andinas están comprendidas en las ecorregiones de Serranía esteparia (4.6 millones de Has)-Puna Seca. Puna (16.9 millones de Has)-Puna húmeda. Solo 10 millones aptas para pastoreo.

La población de la sierra habita, mayormente, entre los 2000 y 3800 msnm, por ser esta zona más adecuada para el desarrollo de actividades agropecuarias. La principal forma de propiedad y explotación es el minifundio y las tierras comunales, teniendo a las comunidades campesinas como las mayores propietarias de las tierras. La actividad agrícola se combina con la ganadera, siendo numerosos los pequeños criadores, principalmente de vacunos, ovinos y camélidos sudamericanos (llamas, alpacas y vicuñas).

El clima de la sierra es variado; las temperaturas medias varían entre los 6°C y 16°C. Las cumbres nevadas ubicadas sobre los 4500 msnm

presentan un clima glacial, y el altiplano soporta un clima frígido. Las vertientes bajas tienen temperaturas moderadas y los valles profundos son cálidos.

En las zonas altas, sobre los 3500 msnm, se encuentran grandes extensiones de pastos naturales: las praderas altoandinas (Flórez, 2005).

1.4. Diversidad en la comunidad vegetal de Puna

La riqueza en diversidad vegetal es enorme. En las praderas altoandinas, se encuentra una diversidad de familias botánicas como las gramíneas. Dentro de esta familia, se encuentran los géneros, como *Festuca*, y dentro de los géneros, las especies, como la *Festuca dolichophylla* (chilligua). Otras familias como las leguminosas, rosáceas, ciperáceas, juncáceas, etc. también tienen esta división; así como un número similar de géneros y especies.

La diversidad encontrada varía de 10 a 90 especies por metro cuadrado, dependiendo de la condición (estado de salud) del pastizal (puede ser excelente, bueno, regular, pobre o muy pobre). De la superficie total de las praderas altoandinas pastoreadas, casi el 80 por ciento presenta una condición que va de regular a muy pobre, lo cual indica que las praderas están sobre pastoreadas, y resalta la necesidad de prestar atención a la conservación in situ de especies vegetales en peligro de extinción.

En las zonas altas, donde la humedad subterránea es abundante, existen los llamados bofedales, áreas que presentan humedad subterránea constante y que se desarrollan normalmente en áreas planas y también en los alrededores de pequeñas lagunas. Su diversidad botánica varía según su

localización, en función de la altitud, topografía, humedad, exposición, latitud, etc. En general, en estas áreas, las especies herbáceas dominan sobre las graminoides y gramíneas. El número de especies también es variable y va de un rango entre 8 hasta 64 especies; siendo, en la mayoría de los casos, la “kunkuna” u “orcco tiña” (*Distichia muscoides*) la más notoria - pertenece a la familia juncácea - es una planta cespitosa, de tallos que tienen forma de aguja (terminados en punta) y se encuentran muy próximos, formando una especie de manto arrosetado de aspecto ondulante y sólido resistente al peso de los animales, especialmente, de los camélidos, para los que constituye su fuente principal de alimentación (Flórez, 2005).

En el ámbito de estudio de la zona alto andina de Ayacucho (Ccarhuaccpampa) y Huancavelica (Huillcani, Quesera y Hospicio) se ha identificado 150 especies de pastos nativos, que corresponden a 59 géneros y 31 familias. Siendo la familia poácea con mayor riqueza de especies, conjuntamente con la familia asterácea (Durand, 2008).

La variación genética determina la forma en que una especie interactúa con su ambiente y con otras especies. Toda la diversidad genética surge en el ámbito molecular y está íntimamente ligada con las características fisicoquímicas de los ácidos nucleicos. A este nivel, la biodiversidad surge a partir de mutaciones en el ácido desoxirribonucleico (ADN), aunque algunas de estas mutaciones son eliminadas por la selección natural o por procesos estocásticos. Por tanto, la diversidad genética de una especie es producto de su historia evolutiva y no puede ser reemplazada (Moreno, 2001).

El empleo de técnicas basadas en marcadores moleculares en estudios de diversidad genética de pastos nativos de la zona alto andina, se inicia con este trabajo de investigación en nuestro país; sin embargo, se cuenta con información recopilada de investigaciones realizadas de pastos en especies diferentes de otros países, tales es así, se puede mencionar la "Caracterización de la diversidad genética del pasto Banderita (*Bouteloua curtipendula*) Michx. (Torr.), mediante marcadores de AFLP. Esta especie nativa de México es de la familia Poácea, del cual no se ha hecho un uso planificado de su riqueza genética y para determinar relaciones genéticas en 90 poblaciones nativas de Banderita, de varios Estados de México, se analizó la expresión de marcadores de polimorfismo de longitud de fragmentos amplificados (AFLP) y su consistencia, mediante cinco combinaciones de iniciadores, diseñados con base en las secuencias de *EcoRI* y *MseI*. Hubo 281 bandas iniciales que mostraron 36.6% de polimorfismo, utilizándose las 104 más consistentes para el análisis. Los coeficientes de Jaccard variaron de 0.0 a 0.82. El número de bandas polimórficas fluctuó desde 11 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, hasta 29 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC. El ACP estableció dos grupos basados en polimorfismo genético que fueron consistentes con los del AC. Los dos primeros componentes principales explicaron 21.8% de la variación total. El ACP proporcionó evidencias para integrar germoplasma de poblaciones de zonas semiáridas de México. El dendograma generado por el método de ligamiento promedio no ponderado entre agrupamientos (UPGMA) dividió las 90 poblaciones en dos grupos. La variabilidad genética en las poblaciones se debió al origen del germoplasma y a movimientos de semilla por

diferentes factores. Las poblaciones nativas de Banderita, en México, mantienen elevados niveles de variación genética, y en este estudio se ha obtenido información útil para su uso y conservación eficiente (Morales *et al*, 2006).

1.5. Marcadores moleculares

Un marcador molecular es un fenotipo molecular producto de la expresión de un gen, como las aloenzimas o los segmentos específicos de ADN en un corrida electroforética (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Se denomina marcadores moleculares a secuencias de ADN que permiten identificar o diferenciar genotipos que pueden ser genes, segmentos de ADN cuya codificación no se conoce y se transmiten de manera mendeliana (López, 2002).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las diferencias en pequeñas secuencias del ADN entre individuos. Las técnicas empleadas para ello son muy diversas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores, los cuales pueden ser de carácter dominante o codominante (Karp y Edwards, 1998; citados en Azofeifa, 2006).

1.5.1. Proteína de reserva en semillas

El estudio de proteínas de almacenamiento en diversidad genética, consiste en que las proteínas de diferentes individuos, poblaciones y especies son homólogas, y que al separarse en un gel producirán bandas similares o diferentes. Esto es debido a que las proteínas carecen de

actividad enzimática y estas son detectadas por técnicas en gel, por medio de técnicas generales de tñido (Becerra y Paredes, 2000).

Las proteínas de reserva como marcador bioquímico tienen una baja influencia ambiental, además permite un análisis rápido de decenas de muestras por ser simple y de bajo costo comparado con otras técnicas. Sin embargo, los distintos patrones electroforéticos detectados pueden tener una base molecular compleja que puede incluir sustituciones, inserciones y pérdidas nucleotídicas. También, las diferencias pueden ser a causa de modificaciones pre y post transcripción y/o traducción. Por otro lado, la cantidad de diversidad genética mediante polimorfismo proteico puede ser subestimada por la no detección de mutaciones silenciosas (Becerra y Paredes, 2000).

1.5.2. Isoenzimas

La técnica consiste en la separación de las enzimas del extracto crudo, en un soporte permeable (almidón PAGE) bajo la acción de un campo eléctrico y seguido de un tñido histoquímica. La separación se hace mediante procedimientos electroforéticos, porque la migración es según la carga y peso molecular (Nuez y Carrillo, 2000; citado en Aquino, 2007).

Las isoenzimas son formas moleculares múltiples dentro de un organismo que catalizan una misma reacción. La base para utilizar datos isoenzimáticos, es que las diferencias de movilidad electroforética de las isoenzimas son resultantes de las diferencias a nivel de secuencias de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Sus desventajas incluyen el bajo nivel de polimorfismo, presentan diferencias de actividad asociadas a diferentes fases de desarrollo de los organismos, pueden o no reflejar los cambios genéticos que ocurren en el ADN, y sólo un grupo de genes estructurales están representados, es decir sólo una parte del genoma puede ser evaluado. Y otro aspecto a considerarse es que pueden ser afectadas cualitativa y cuantitativamente en su nivel de expresión por factores ambientales (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.3. Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD)

Consiste en una PCR usando iniciadores aleatorios de 10 pb para amplificar el ADN. Los productos de amplificación son separados mediante electroforesis y las bandas visualizadas, de diferente peso molecular, representan diferentes loci.

Los resultados RAPD, obtenidos en plantas, indican su herencia dominante, su habilidad para detectar regiones de ADN altamente variables (5 a 10 loci por iniciador), su potencialidad en el mapeo de genes, identificación de razas, estudio de hibridación inter e intraespecífica y en el estudio de variación genética en poblaciones altamente emparentadas.

Las ventajas de esta técnica son la rapidez en la obtención de resultados, el no uso de radioactividad, menor inversión en equipos y la cantidad reducida de ADN requerida. Sin embargo, la desventaja aparece en la inconsistencia de datos debido a que pueden dar origen a resultados diferentes por falta de uniformidad de las condiciones de laboratorios con

pequeñas alteraciones en los parámetros de amplificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.4. Secuencias sencillas repetidas (SSR)

Los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR) son regiones de secuencias repetidas pequeñas de 2 a 10 pares de bases, arregladas en serie, las cuales se asume que están distribuidas al azar por todo el ADN (Azofeifa, 2006).

Las regiones que contienen secuencias sencillas repetidas son amplificadas individualmente a través de PCR a partir de un par de “primers” específicos (de 20 a 30 bases) complementarias a las secuencias únicas que flanquean al microsatélite. Así, cada “isla” microsatélite, independientemente del elemento repetido (CA, TG, ATG, etc.) constituye un *locus* genético altamente variable, multialélico de gran contenido informativo. Cada segmento amplificado de tamaño diferente (generalmente de varias decenas hasta algunas centenas de pares de bases) representa un alelo diferente del mismo *locus* (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El microsatélite amplificado por PCR es sometido a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 ó 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un microsatélite. Estos marcadores son codominantes, genoma-específicos y altamente polimórficos (Echenique *et al*, 2004).

1.5.5. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP)

Ferreira y Grattapaglia (1998), definen como el polimorfismo observado en la longitud de los fragmentos obtenidos por el corte de la doble cadena de ADN. Este polimorfismo es generado por la presencia o ausencia de los sitios de restricción en el genoma, así como las diferencias en las secuencias del ADN entre los sitios de restricción.

Está basada en la digestión del ADN total de un individuo con diferentes enzimas de restricción. Los fragmentos resultantes son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos por capilaridad a una membrana de nylon (Southern Blot). Esta membrana es hibridada con una sonda (radioactiva o no). El producto de la hibridación es visualizado por autoradiografía de rayo X, de acuerdo al peso molecular de la banda.

Los marcadores RFLP son codominantes, permiten estudiar el genoma con una mayor cobertura al incluir secuencias codificadoras y no codificadoras del ADN (exones e intrones). Sus principales ventajas son la presencia de un número ilimitado de ellos, no son afectadas por el medio ambiente, no presenta efectos pleiotrópicos, y pueden ser evaluadas en cualquier etapa de desarrollo del organismo. Sus principales desventajas se incluyen el uso de radioactividad y las tareas laboriosas, lentas y caras que deben ser llevadas a cabo como es la clonación de las sondas y detección de RFLP en las membranas (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.6. Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados de ADN (AFLP)

Representa la tecnología más reciente que combinan los principios de los RFLP y PCR, para la obtención de un gran número de marcadores moleculares distribuidos en genomas de procariontes y eucariontes. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de detección de polimorfismo vía PCR (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los AFLPs son considerados marcadores de alta eficacia, permiten el análisis de un elevado número de *loci* por experimento sin requerir información previa sobre su secuencia, son en su mayoría dominantes y altamente reproducibles (Karp *et al*, 1997; SIDTA, 1999; citados en Azofeifa, 2006). Además, los marcadores AFLP no permiten la detección de heterocigotos, o sea, no es posible distinguir si una banda en el gel es resultado de la amplificación de uno o de dos alelos (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

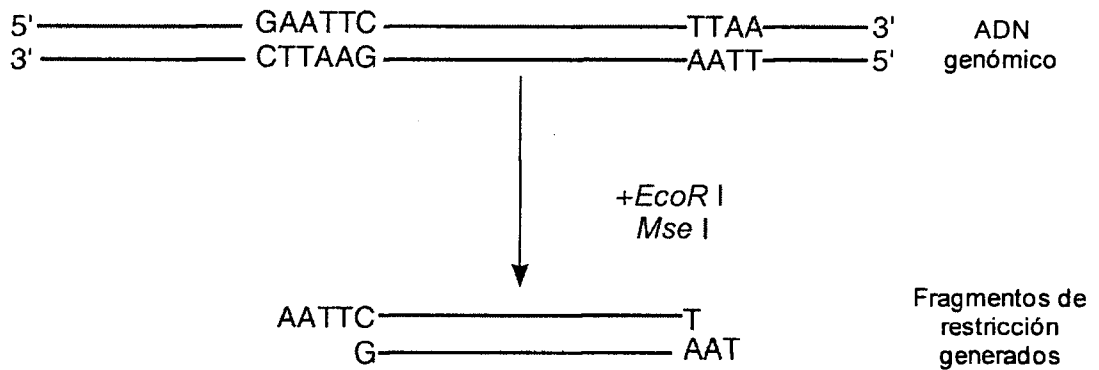
a. Base genética y detección de marcadores AFLP

Esta técnica consta esencialmente de cuatro etapas. En la primera etapa el ADN genómico total del individuo es cortado con dos enzimas de restricción. En la segunda etapa, se incorporan adaptadores específicos a los extremos de los fragmentos genómicos generados por la digestión enzimática. En la tercera etapa, una fracción de los fragmentos generados son amplificados selectivamente vía PCR utilizando "primers" específicamente diseñados para reconocer las secuencias en los adaptadores. En la cuarta y

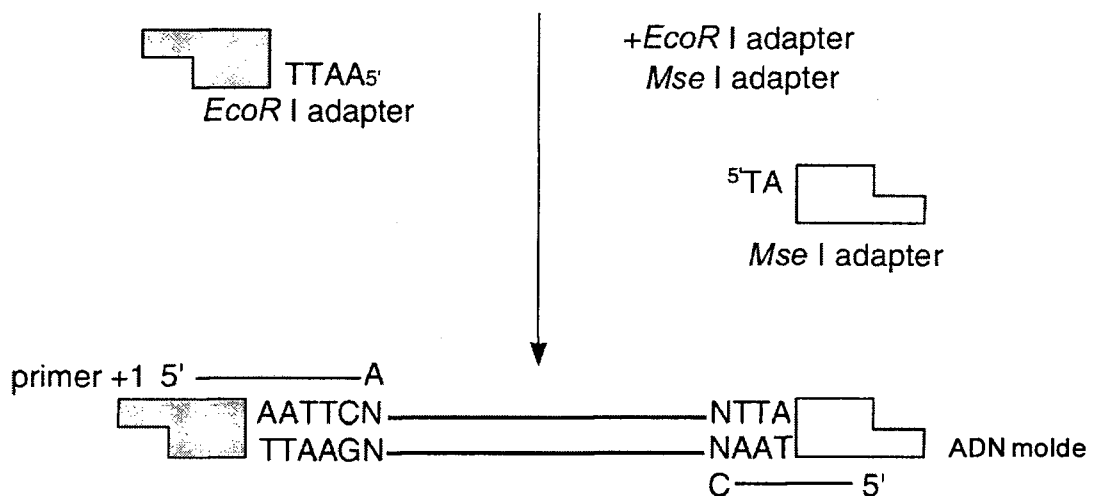
última etapa la subpoblación de fragmentos amplificados es separada mediante su desnaturalización por electroforesis en geles de alta resolución (poliacrilamida) y visualización por tinción con nitrato de plata (Echenique *et al*, 2004; Ferreira y Grattapaglia, 1998). Es decir, los fragmentos de ADN son separados por sus respectivos tamaños al hacerlos correr electroforéticamente por un gel y luego son tratados con nitrato de plata para teñirlos y así poder visualizarlos como bandas oscuras, los cuales constituyen una gran cantidad de datos discretos que pueden ser analizados estadísticamente. Por tanto, la diferencia entre individuos se evidencia cuando los fragmentos de un cierto tamaño, aparecen sólo en algunos de ellos, mientras que en otros no; cuanto más similares genéticamente sean dos individuos, compartirán mayor cantidad de fragmentos de ADN de igual tamaño (Torales *et al*, 2002).

El procedimiento de AFLP consta de 4 etapas fundamentales:

Digestión del ADN con dos enzimas de restricción diferentes, uno de los cuales hace cortes frecuentes (enzima de restricción de cuatro bases *MseI*) y el otro corte poco frecuentes (enzima de restricción de seis bases *EcoRI*); generando fragmentos de restricción con extremos cohesivos específicos a los adaptadores.

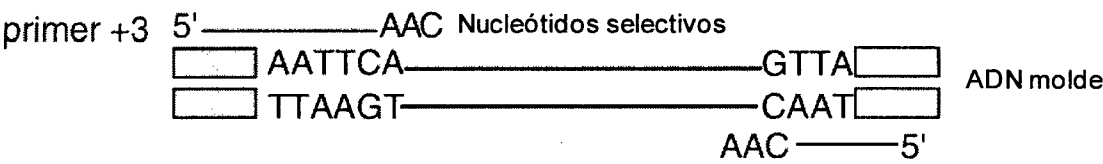


En la segunda etapa se ligan adaptadores oligonucleótidos a los extremos de los fragmentos de ADN, donde dichos adaptadores sintéticos son específicos de cada sitio de restricción al ADN digerido, para conformar el ADN molde para las amplificaciones. La secuencia de los adaptadores y los sitios de restricción adyacentes sirven como sitio de unión al iniciador para las amplificaciones de los fragmentos de restricción.

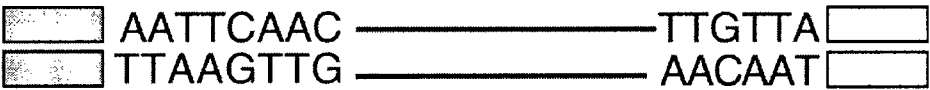


En la tercera etapa se amplifican subconjuntos específicos de los productos de digestión del ADN empleando combinaciones de cebadores selectivos. Se realiza una primera PCR (preselectiva), usando cebadores

oligonucleótidos complementarios al adaptador y a los sitios de restricción. 3 nucleótidos selectivos son incluidos en los extremos 3' de los iniciadores, los cuales sólo podrán amplificar aquel subconjunto del ADN molde que sea complementario a dichos nucleótidos selectivos.



En la cuarta y última etapa, los productos de la amplificación preselectiva se someten a otra PCR, y nuevamente se selecciona un subconjunto de fragmentos. El subconjunto de fragmentos amplificados por los iniciadores con los nucleótidos selectivos, son separados en geles denaturnantes de poliacrilamida para generar un patrón de bandas de ADN genómico analizados. Las amplificaciones selectivas de la técnica AFLP tiene una fase de “touch down” la cual permite tener distintas temperaturas de annealing para mejorar la eficiencia de los productos de amplificación de los iniciadores (IPGRI, 2003; Invitrogen, 2003).



Electroforesis en gel denaturante de poliacrilamida

- [EcoRI] *MseI* secuencia del adaptador
- [MseI] *EcoRI* secuencia del adaptador

b. Ventajas de los marcadores AFLP

La ventaja que más destaca es el gran número de fragmentos que se originan y revelan en un único gel. El índice de “multiplex” del ensayo AFLP, es decir, el número de marcadores simultáneamente analizados en un único gel, es el más alto entre las tecnologías de marcadores disponibles. La tecnología de AFLP, es por tanto, muy eficiente para el muestreo amplio y simultaneo de un genoma.

La segunda ventaja de la tecnología de AFLP es el gran poder de detección de variabilidad genética. Ya que explora simultáneamente el polimorfismo de presencia y ausencia de sitios de restricción, como el ensayo RFLP y la existencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias, tal como el ensayo RAPD. El AFLP no requiere información previa de la secuencia de ADN (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

La tercera ventaja de esta tecnología es la mayor robustez del ensayo AFLP comparado con el ensayo RAPD. Esto se debe básicamente a que se utilizan “primers” más largos en la etapa de PCR, lo que aumenta significativamente la especificidad, evitando la competición que ocurre durante la PCR en el ensayo RAPD.

c. Limitaciones de los marcadores AFLP

La principal limitación de los marcadores AFLP es el bajo contenido de información genética por locus. Sólo se detecta un alelo, o sea, el fragmento que se amplifica. Las demás variaciones alélicas son clasificadas conjuntamente como un alelo nulo. Por tanto, los marcadores AFLP son “dominantes” y los datos tienen naturaleza binaria.

El análisis AFLP incluye un mayor número de etapas. Es necesaria una mayor cantidad de reactivos (enzimas de restricción, adaptadores y “primers” específicos) y un mayor número de equipamiento de biología molecular.

El ADN necesario debe ser más puro, lo que demanda métodos de extracción más elaborados, para el éxito de la técnica AFLP. La digestión parcial durante la primera etapa del ensayo AFLP da como resultado serios problemas de interpretación de polimorfismo (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

1.5.7. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Esta técnica consiste en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una polimerasa de ADN termoestable (Echenique *et al*, 2004). La reacción de PCR se basa en el apareamiento y la polimerización enzimática de un par de oligonucleótidos (pequeñas moléculas de ADN de cadena sencilla) utilizados como iniciadores (“primers”) que delimitan la secuencia de ADN de doble cadena, “blanco” de la amplificación (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

El método implica la ejecución de una serie repetida de ciclos (conocidos como ciclos térmicos), cada una de las cuales involucra la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa. Lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Azofeifa, 2006). Por su parte Bruce *et al* (2003), manifiesta que la amplificación efectiva del ADN requiere en la práctica unos 20-30 ciclos de reacción, en los que los productos de cada

ciclo actúan como moldes de ADN para el ciclo siguiente. Cada ciclo sólo requiere aproximadamente 5 minutos. Por tanto, el método de PCR permite la clonación de un fragmento de ADN en un “sistema libre de células” en pocas horas.

Rallo *et al* (2002), citado en Azofeifa (2006), menciona que la gran mayoría de los marcadores moleculares de ADN, de uso actual, se basan en la técnica de PCR.

1.6. Análisis de diversidad genética utilizando marcadores moleculares

Diversidad genética define la cantidad de variación genética presente en una población o especie como consecuencia de su vida evolutiva. FAO (2003), citado en Aquino (2007), da una definición cuantitativa de diversidad genética como el número de alelos diferentes por loci y la proporción de loci con más de un alelo en una especie o población.

Para cuantificar la variación genética dentro de la poblaciones, los datos moleculares se utilizan para determinar el nivel promedio de heterocigosidad, la proporción de loci polimórficos y el total o el promedio del número de alelos por locus (Moreno, 2001).

Marshall y Brown (1975), sugirieron que la cuantificación de la diversidad genética es la ofrecida por la media del número de alelos por loci, en (Vilela *et al*, 1997; Crossa *et al* 2001; citado en Rimachi, 2005), consideran que la diversidad genética de la población depende de dos factores, del número y de la frecuencia de los alelos a través de los loci, y de la estructura de la población.

1.6.1. Análisis básico de diversidad genética

La mayoría de los análisis de diversidad genética, incluye los siguientes pasos (IPGRI, 2004):

- ❖ *La descripción de la diversidad*; dentro de una población o entre poblaciones.
- ❖ *El cálculo de las relaciones entre las unidades analizadas*; esto implica el cálculo de las distancias (geométrica o genética) entre todos los pares de clases analizadas en el estudio.
- ❖ *La expresión de estas relaciones con cualquier método de ordenación y/o clasificación disponible*; algunos de estos métodos permiten comparar los resultados de nuestro estudio molecular con otros tipos de datos (por ejemplo, geográficos). En la **Figura 1-1**, los Ind1, Ind2,... pueden representar poblaciones o regiones, en vez de individuos.

1. Descripción de la variación dentro de poblaciones, regiones, etc. Y entre ellas.

	Individuos					
m D a r t c o a s d o r e e s	1	0	1	1	0	1
	1	0	0	0	1	1
	0	1	1	0	1	0
	1	0	0	0	1	1
	0	0	1	1	0	0
	1	1	1	0	0	0
	1	0	1	0	1	1

2. Evaluación de las relaciones entre individuos, poblaciones, regiones, etc.

	01	02	03	04	05	06
01	0					
02	0.56	0				
03	0.33	0.33	0			
04	0.47	0.26	0.50	0		
05	0.32	0.43	0.37	0.28	0	
06	0.33	0.56	0.56	0.37	0.46	0

3. Expresión de las relaciones entre los resultados obtenidos con diferentes tipos de caracteres.

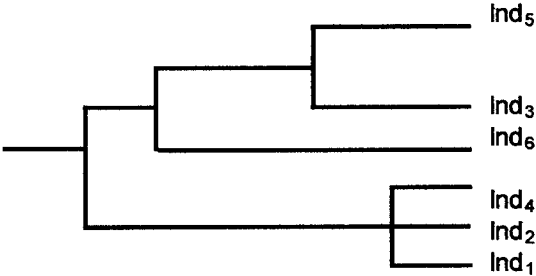


Figura 1-1. Análisis básico de la diversidad genética (IPGRI, 2004).

1.6.2. Proporción de loci polimórfico

Expresa el porcentaje de loci variables en una población, su cálculo se basa en el conteo directo de loci polimórfico y totales; es el número de loci polimórfico dividido por el número total de loci (polimórficos y monomórficos) (IPGRI, 2004).

1.6.3. Heterocigosidad promedio esperada (H_e) (diversidad genética de Nei)

Es la probabilidad de que, en un locus único, cualquier par de alelos, escogidos al azar de la población, sean diferentes entre sí. Tres cálculos son posibles:

- ❖ Un locus con dos alelos: $h_j = 1 - p^2 - q^2$
- ❖ Un locus j con i alelos: $h_j = 1 - \sum p_i^2$
- ❖ Promedio para varios loci: $H = 1 - \sum_j h_j / L$

Donde,

h_j : la heterocigosidad por locus.

p y q : las frecuencias alélicas.

H : la heterocigosidad promedio para varios loci.

L : el número total de loci.

La heterocigosidad (H) es ampliamente usada para medir la diversidad alélica o la informatividad de un marcador genético para un locus con varios alelos (Nei, 1973; citado en (Rimachi, 2005); sin embargo, no se puede estimar la heterocigosidad promedio (H_e) con los marcadores dominantes porque no permiten discriminar entre individuos heterocigotos y

homocigotos. A pesar de ello, se puede calcular la diversidad génica dentro de un locus (h_i) para cada locus, y luego la diversidad génica promedio (H_i) (IPGRI, 2004).

El Índice de Contenido Polimórfico (PIC), sinónimo de diversidad genética, resulta ser la probabilidad de que un marcador encuentre diferencias entre dos individuos en al menos 1 locus (Duque, 1998). Los valores de PIC varían desde 0, monomórfico o no discriminativo, hasta 1, muy polimórfico o altamente discriminativo, con varios alelos en igual frecuencia (Smith *et al*, 1997; citado en Rimachi, 2005).

1.6.4. Índice de similitud y disimilitud

Expresan el grado en que dos muestras son semejantes por las especies presentes en ellas, se refiere al cambio de especies entre dos muestras. Sin embargo, a partir de un valor de similitud (s) se puede calcular fácilmente la disimilitud (d) entre las muestras: $d=1-s$. Estos índices pueden obtenerse con base en datos cualitativos o cuantitativos directamente o a través métodos de ordenación o clasificación de las comunidades (Magurran, 1988; citado en Moreno, 2001).

Entre los coeficientes más usados para un análisis de conglomerado se encuentran el coeficiente de similitud de Dice y el de Jaccard. Este último es equivalente al coeficiente de Gower y se caracteriza por no considerar los apareamientos negativos, siendo el más simple entre los de su clase. Los coeficientes de similitud y distancia son estimadores cuantitativos que describen el grado de asociación o semejanza entre los elementos

comparados, expresado en valor numérico, entre 0 y 1, o en porcentaje (0 y 100%, respectivamente) (Albany *et al*, 1998).

Es usado para comparar entradas cuyas variables (bandas) son evaluadas en una escala de doble estado (presencia y ausencia). Se calcula a partir de una matriz base, comparando, de par en par, todas las entradas contra las otras, generándose así una matriz de similitud. Los valores varían de uno a cero, indicando el primero máxima similitud y lo contrario el segundo (Dice, 1945; Nei y Lei, 1979).

Coeficiente de similitud Jaccard (J)

Consiste en una medida similar al coeficiente de correlación donde el valor máximo de uno se da cuando la similitud de los genotipos comparados es total y cero cuando difieren completamente, de tal manera que valores bajos expresan distancias genéticas grandes y viceversa. Por la característica dominante de los marcadores AFLP el coeficiente de similitud JACCARD (Jaccard, 1908) es uno de los más apropiados para este análisis, debido a que el coeficiente se basa en caracteres de presencia ó ausencia. Si se tienen dos líneas L_i y L_j y se definen las cantidades a_{ij} como el número de bandas en común entre las dos líneas, b_{ij} el número de bandas presentes en la línea L_i y ausentes en la línea L_j , c_{ij} el número de bandas ausentes en L_i y presentes en L_j , el coeficiente de Jaccard se define como:

$$s_{ij} = \frac{a_{ij}}{a_{ij} + b_{ij} + c_{ij}}$$

Donde:

a_{ij} : número de veces que ambos individuos tienen presente el mismo carácter (coincidencias 1-1).

b_{ij} : número de veces que el primero de ellos tiene el carácter presente y el segundo ausente (1,0).

c_{ij} : número de veces que el primero de ellos tiene el carácter ausente y el segundo presente (0,1).

1.6.5. Árboles de distancia genética

La matriz con los índices de similitud (matriz de distancia) contiene toda la información que proporcionan los marcadores genéticos estudiados acerca de la relación entre las entradas analizadas, pero es difícil interpretarla, por lo que esos datos son usados para un análisis de agrupamiento y mediante representaciones gráficas, llamados árboles genéticos o dendogramas, facilitándose así la interpretación. Por tanto un dendograma es la representación gráfica de la matriz de similitud.

Existen dos métodos para construir dendogramas: Fenético y Cladístico. El segundo método contiene información acerca de la ascendencia y por tanto pueden usarse para estudios de comportamiento evolutivo. Con el método fenético se obtienen árboles filogenéticos considerando el conjunto de similitudes fenotípico. En estos árboles se clasifican organismos basándose sólo en el número absoluto de caracteres

que comparten, utiliza algoritmos rápidos y tienen propiedades estadísticas más adecuadas para datos moleculares (Martínez y Vega, 2002). Para construir árboles con el método fenético se usan algoritmos de agrupamiento como el método de Medias Aritméticas no Ponderadas (UPGMA).

Método de agrupamiento de pares no ponderados (UPGMA)

El análisis de agrupamiento fue realizado mediante el método de UPGMA o método de agrupamiento de pares no ponderados usando la media aritmética. Este método minimiza la distancia entre grupos, al tomar la distancia promedio de todos los pares entre los individuos de la muestra (Rohlf, 1993). Mediante este análisis es posible dividir una población de individuos en un número determinado de subgrupos, optimizando el grado de homogeneidad interna de cada uno (Quevedo, 1993; citado en Silvestre, 2008).

1.6.6. Coeficiente de correlación cofenética (r)

Es la medida de distorsión de un árbol genético con respecto a su matriz de similitud. Mide el grado de ajuste entre la matriz cofenética que representa el árbol genético y la matriz de distancia que le dio origen, de acuerdo al método de agrupamiento utilizado. Con este análisis se determina el nivel de correlación del producto-momento (r), si este es superior a 0.8 se dice que la representación de la matriz de similitud por el árbol genético, es buena (Rohlf, 1993).

1.6.7. Bootstrap

Es una técnica estadística de remuestreo de datos de loci que permite dar los valores fiables (%) de los grupos en un árbol genético y dotan al mismo tiempo de un alto grado de confianza. Este análisis implica la creación de un lote de datos realizando un muestreo aleatorio de n caracteres o loci y reemplaza los datos originales. De esta manera se obtiene un lote de datos del mismo tamaño que la original, pero algunos caracteres quedan excluidos y otros están duplicados. La variación al azar de los resultados obtenidos de analizar estos lotes de datos remuestreados estadísticamente, es la típica que se conseguiría si se obtuvieran nuevos lotes de datos (Martínez y Vega, 2002).

1.6.8. Distribución geográfica

Se ha desarrollado un software, DIVA-GIS 5.2, con el cual se hacen análisis de base de datos de colecciones biológicas como bancos de germoplasma y herbarios para dilucidar los patrones genéticos, ecológicos y geográficos en la distribución de especies cultivadas y nativas. Entre las funciones analíticas de DIVA-GIS se incluyen el mapeo de riqueza y diversidad de especies basados en datos de marcadores moleculares. Con esta función se analizan datos de presencia y ausencia utilizando las distancias genéticas calculadas con los índices de Jaccard, Nei y Li, y Sokal y Michener (Hijmans *et al*, 2004).

CAPITULO II

MATERIALES Y METODOS

2.1. Ubicación y caracterización del área de trabajo

2.1.1. Ubicación geográfica y política de los pastizales

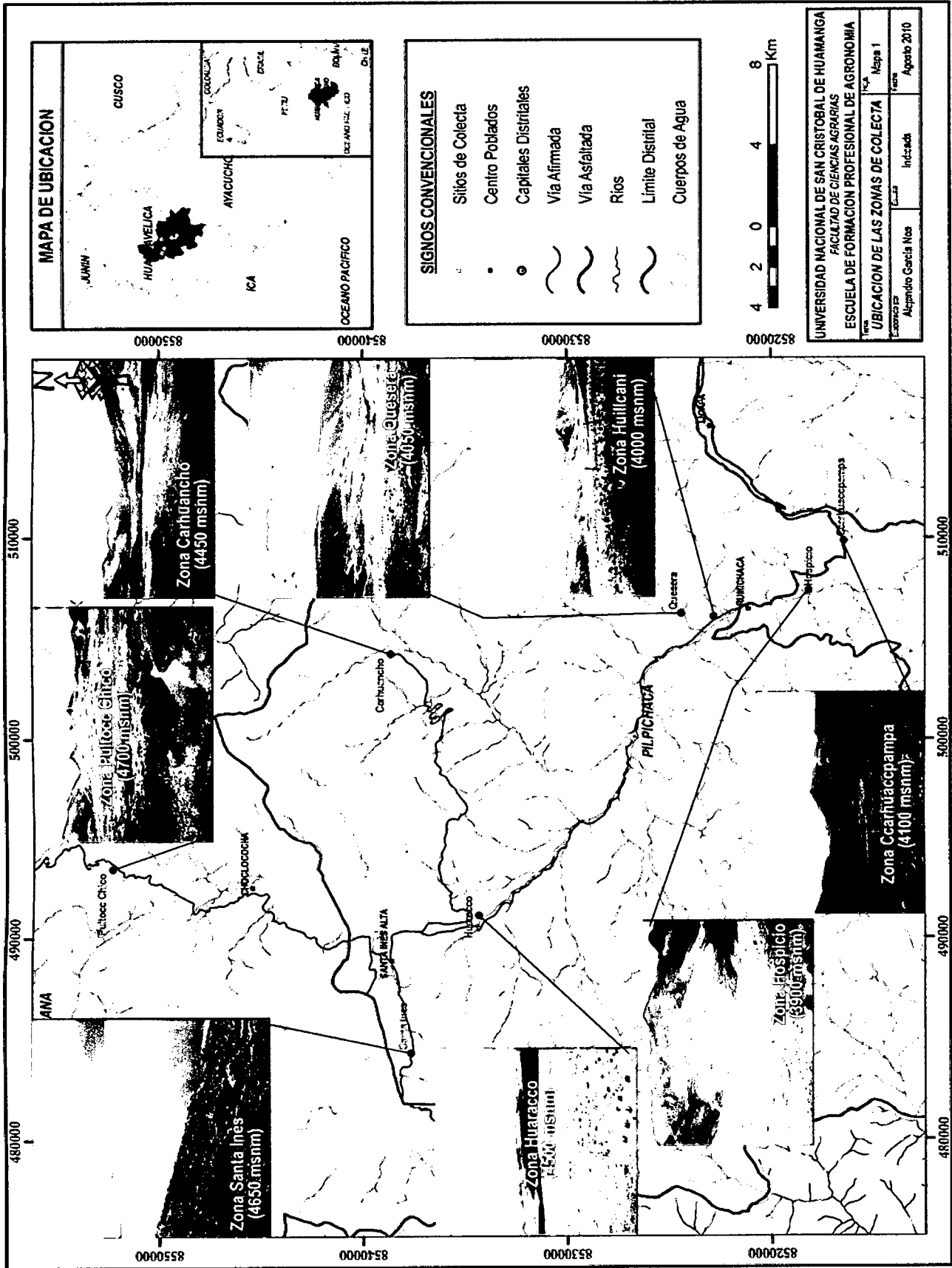
La recolección de las especies forrajeras nativas, se realizó en los pastizales naturales alto andinos, ubicados en las zonas de Ccarhuaccpampa y Hospicio (Ayacucho); y Huillcani, Quesera, Huaracco, Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuancho (Huancavelica); cuyos detalles geográficas y políticas se muestra en la **Tabla 2-1 y Mapa 01**.

Tabla 2-1. Ubicación Geográfica y Política de las zonas de recolección de pastos nativos.

Código zona	Zonas	Distrito	Provincia	Dpto.	Latitud	Longitud	Altitud (msnm)
HO	Hospicio	Paras	Cangallo	Ayacucho	13°24'16"	74°55'55"	3900
HL	Huillcani	Pilpichaca	Huaytará	Huancavelica	13°21'45"	74°56'38"	4000
QE	Quesera	Pilpichaca	Huaytará	Huancavelica	13°20'53"	74°56'33"	4050
CC	Ccarhuaccpampa	Paras	Cangallo	Ayacucho	13°25'12"	74°54'33"	4100
CH	Carhuancho	Pilpichaca	Huaytará	Huancavelica	13°13'10"	74°57'40"	4450
HC	Huaracco	Pilpichaca	Huaytará	Huancavelica	13°15'30"	75°04'55"	4500
SI	Santa Inés	Pilpichaca	Huaytará	Huancavelica	13°13'41"	75°08'42"	4650
PC	Pultocc Chico	Santa Ana	Castrovirreyna	Huancavelica	13°05'45"	75°03'37"	4700

a. Composición florística de los pastizales nativos altoandinos

Los pastizales nativos del lugar de investigación entre 3900 y 4700 msnm (Tabla 2-1), se caracterizan por presentar una gran diversidad de especies en su mayoría de porte bajo, con predominancia de la *Muhlenbergia ligularis*, *Calamagrostis vicunarum*, *Stipa brachyphylla*, *Trifolium amabile* y en menor porcentaje de especies como el *Festuca dolichophylla*, *Calamagrostis rigescens*, *Scirpus rigidus*, *Bromus lanatus* y otras; condición que se puede observar en las zonas de Ccarhuaccpampa, Hospicio, Quesera, Carhuancho, Santa Inés y Pultocc Chico. En las 4 últimas zonas, además de las especies mencionadas, presenta la *Poa perligulata* y en la 2 últimas zonas está ausente el *Trifolium amabile*. En los en los pastizales de Huillcani se observó especies de porte alto como el *Stipa ichu* y *Stipa obtusa*, asociado a éstas se observan especies como el *Muhlenbergia peruviana*, *Trifolium amabile*, *Calamagrostis vicunarum*, *Stipa brachyphylla*, *Muhlenbergia ligularis*, *Scirpus rigidus* y otras. En los pastizales de Huaracco, está ausente las especies *Muhlenbergia peruviana*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile* (Durand, 2008).



b. Características del suelo en los pastizales nativos altoandinos

Según los análisis físico-químico de suelos de los pastizales, realizados en el Laboratorio de Análisis de suelos y foliar “Nicolas Roulet”-UNSCH, presentan un pH muy ácido con valores menores a 5.5. Materia orgánica entre 3.5 nivel medio hasta 5.9 que corresponde a un nivel alto. Fósforo disponible con valores de 2.1 a 12.0 ppm muy bajo hasta bajo. Potasio disponible con valores de 139 a 197.8 que indican alto a muy alto en contenido de potasio. Los valores de CIC superan los 20 meq/100, por tanto representan niveles altos en os suelos de los pastizales nativos altoandinos (Tabla 2-2).

Tabla 2-2. Análisis físico-químico de los suelos de los pastizales nativos alto andinos.

Lugar	Are	Lim	Arc	Clase Textural	pH (H2O)	MO (%)	N Total (%)	Cationes Dispon. (ppm)		Cationes Cambiables (meq/100g)			CIC meq/ 100
								P	K	Ca++	Mg++	K+	
Ccarhuaccpampa	40.4	26.8	32.8	Fr-arcilloso	5.2	5.07	0.25	3.86	139.0	11.12	0.15	0.71	24.0
Huilcani	46.4	20.8	32.8	Fr-Arci-Aren	5.1	5.88	0.29	2.11	155.0	2.88	0.10	0.79	29.0
Quesera	50.8	21.7	27.6	Fr-Arci-Aren	5.3	4.37	0.22	4.91	170.0	3.52	0.15	0.87	21.0
Hospicio	42.4	23.2	34.4	Fr-arcilloso	4.8	3.50	0.18	7.72	160.0	11.92	0.20	0.82	29.0
Carhuanchu				Fr-arcilloso	5.1	5.90	0.30	12.00	197.8	9.60	0.40	1.00	23.5
Promedio					5.1	4.9	0.2	6.1	164.4	7.8	0.2	0.8	25.3

Fuente: Laboratorio de suelos "Nicolas Roulet" del programa de pastos y ganadería-UNSCH (2007).

c. Características del clima en los pastizales nativos altoandinos

Se puede observar en la Tabla 2-3 y Figura 2-1, que la temperatura mínima absoluta se registra en los meses de julio y agosto con variación de - 6.40 a 0°C, mientras que la temperatura máxima absoluta se presenta en los meses de noviembre a enero con variaciones de 10.90 a 17.80°C y la media mensual varia de 3.8- 8.4°C. Por otra parte, la precipitación mínima mensual

corresponde al mes de julio de 0.0 mm y la precipitación máxima se presenta en el mes de marzo de 166.80 mm.

Tabla 2-3. Temperaturas medias y precipitación mensual (2007) de la estación meteorológica Apacheta (4150 msnm).

Meses	Temperaturas promedio (°C)			Precipitación (mm)
	Mínima	Máxima	media	
Ene	0.0	16.8	8.4	111.6
Feb	-0.8	15.6	7.4	101.6
Mar	0.2	14.6	7.4	166.8
Abr	-0.2	13.0	6.4	95.0
May	-3.4	14.4	5.5	38.0
Jun	-3.8	14.2	5.2	4.5
Jul	-6.4	14.0	3.8	0.0
Ago	-5.4	16.8	5.7	16.3
Set	-3.0	13.2	5.1	76.0
Oct	-3.2	17.0	6.9	76.8
Nov	-2.7	17.8	7.6	48.8
Dic	-3.0	17.4	7.2	174.1

Fuente: red hidrometeorológica OPEMAN

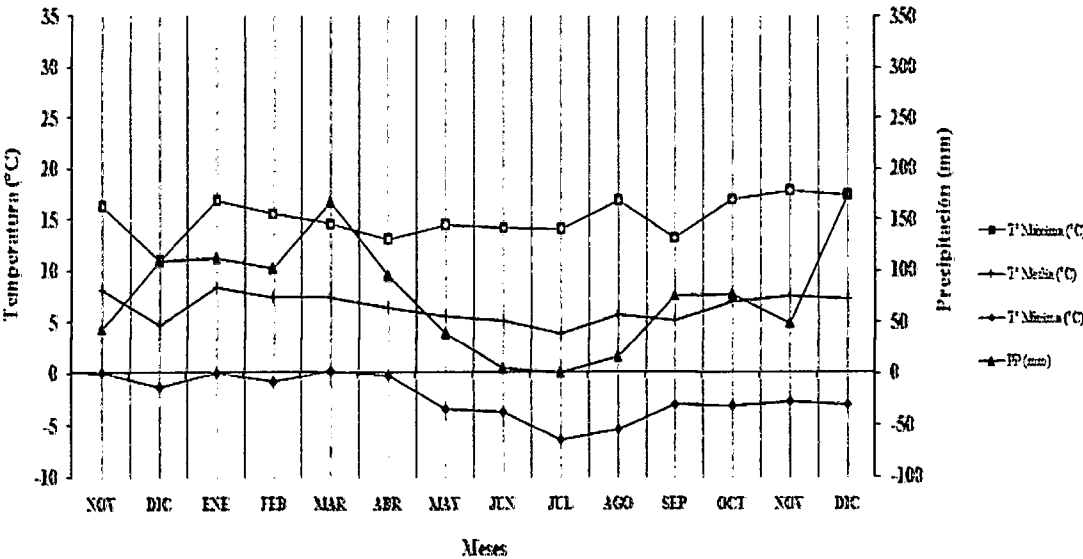


Figura 2-1. Diagrama ombrotérmica (T°C vesus Pp mm) con datos de clima de la estación Apacheta, de los pastizales nativos altoandinos.

2.1.2. Ubicación geográfica y política del laboratorio molecular

El análisis de diversidad genética de pastos nativos altoandinos, mediante marcadores AFLP, se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), Estación Experimental Agraria La Molina, del distrito de La Molina; provincia de Lima; departamento de Lima. Localizados geográficamente a 12°04'24" latitud sur y 76°56'10" longitud oeste, a una altitud de 241 msnm.

2.2. Descripción de materiales

2.2.1. Material biológico

Se recolectaron 30 plantas de “chilligua” (*Festuca dolichophylla*) y “atunchiji” (*Muhlenbergia ligularis*), de las zonas alto andinas de Ccarhuaccpampa, Huillcani, Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuancho. Asimismo, 30 plantas de *Poa perligulata* en las comunidades campesinas de Quesera, Huaracco, Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuancho. Otras 30 plantas de “layo” (*Trifolium amabile*) en las comunidades de Ccarhuaccpampa, Hospicio, Huillcani, Quesera y Carhuancho (**Anexo 1**). En cada zona de estudio se recolectó 6 plántulas por especie, y se analizaron 120 colectas de las 4 especies de pastos nativos de las 8 zonas altoandinas seleccionadas (**Tabla 2-4**).

2.2.2. Materiales e insumos en general

Los materiales, insumos, soluciones, la instrumentación y los diversos programas informáticos utilizados durante la realización de este trabajo, se presentan en el **Anexo 2**.

Tabla 2-4. Relación de muestras colectadas y analizadas por especies, zonas ecológicas y sitios (A, B y C) de los pastizales nativos altoandinos.

Zonas ecológicas alto andinas	<i>F. Dolichophylla</i>			<i>P. Perigulata</i>			<i>M. ligularis</i>			<i>T. amabile</i>			Total
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
Hospicio	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2	2	6
Huillcani	2	2	2	0	0	0	2	2	2	2	2	2	18
Quesera	0	0	0	6	0	0	0	0	0	6	0	0	12
Ccarhuaccpampa	3	3	0	0	0	0	3	3	0	3	3	0	18
Carhuancho	2	2	2	2	0	4	2	2	2	0	3	3	24
Huaracco	0	0	0	3	3	0	0	0	0	0	0	0	6
Santa Inés	2	2	2	2	2	2	2	2	2	0	0	0	18
Pultocc Chico	2	2	2	2	2	2	0	0	6	0	0	0	18
Total	30			30			30			30			120

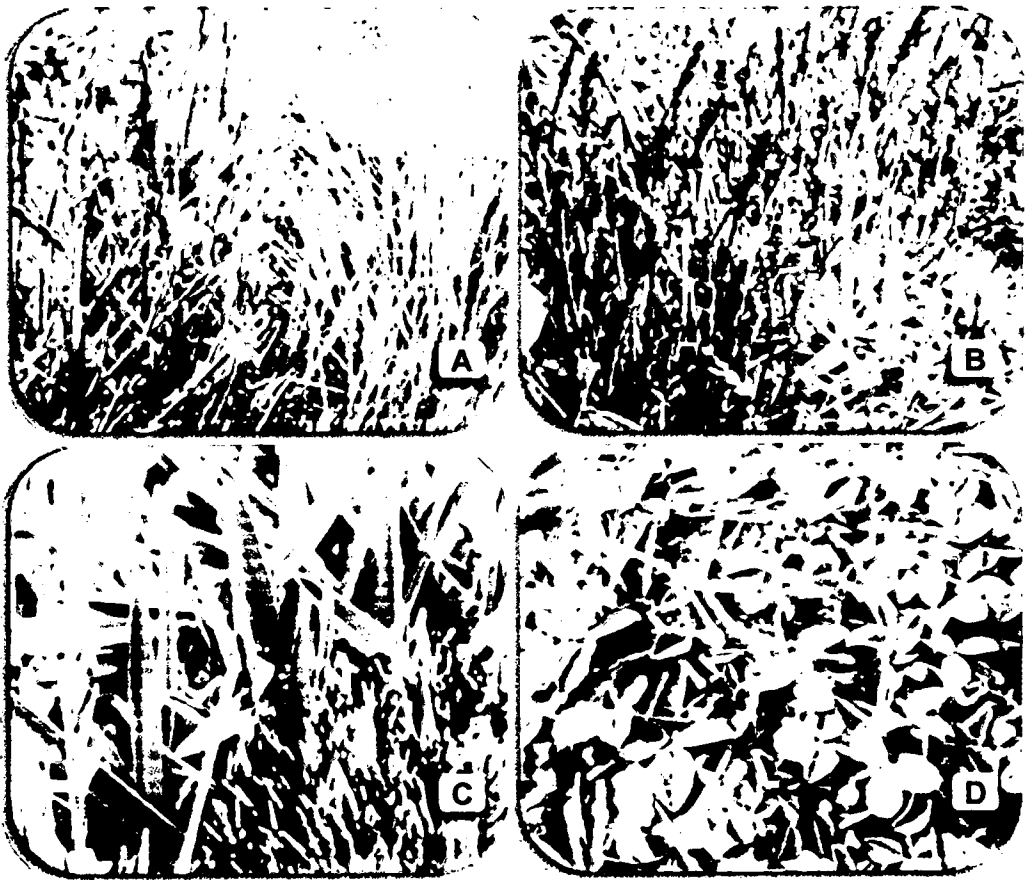


Figura 2-2. Especies forrajeras nativas altoandinas. A) *Festuca dolichophylla*. B) *Poa perigulata*. C) *Muhlenbergia ligularis*. Y D) *Trifolium amabile*.

2.3. Metodología de obtención de muestras en campo

2.3.1. Identificación de especies y selección de las zonas de recolección

En función a la presencia de las especies forrajeras nativas en estudio identificado mediante guías e información de morfología (Tovar y Oscanoa, 2002; Mostacero *et al*, 2002), y de acuerdo al piso ecológico (altitud msnm), se seleccionó las zonas de recolección de las especies forrajeras nativas alto andinas. Para la colecta, se identificó las especies forrajeras nativas a estudiar; al mismo tiempo, se registró los datos de posición con el GPS así como las distancias referenciales entre zonas de colecta; datos que fueron confirmados en gabinete, mediante el estudio de cartas geográficas digitalizadas e impresas, adquiridas del Instituto Geográfico Nacional (**Mapa 01**).

2.3.2. Recolección de muestras

Debido a que son muy exigentes los protocolos de análisis de laboratorio es necesario partes tiernas de la planta y por presentar las especies forrajeras nativas altas concentraciones de fibra, se recolectó plantas completas de pastos, las mismas que posteriormente fueron trasplantadas bajo condiciones de invernadero de la SUDIRGEB (INIA-Lima) (**Figura 2-3**).

Se extrajo 6 plantas de pastos por especie y zona. En cada zona se determinó de 2 a 3 puntos de recolección, y en cada punto se cogió de 2 a 3 plantas al azar. La distancia entre sitios de recolección (A, B y C) fue de 100 a 500 m y entre plantas (P) de 10 a 50 m aproximadamente (**Figura 2-4**).

Las muestras fueron colocadas en bolsas de papel con sus respectivos códigos de identificación (especie, lugar y zona).

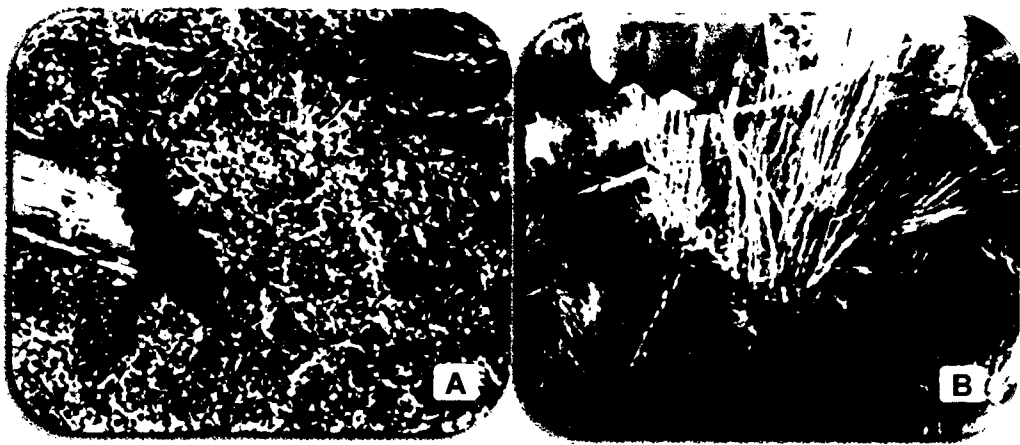


Figura 2-3. Recolección de plantas completas de pastos nativos altoandinos. A) *Muhlenbergia ligularis*. Y B) *Festuca dolichophylla*.

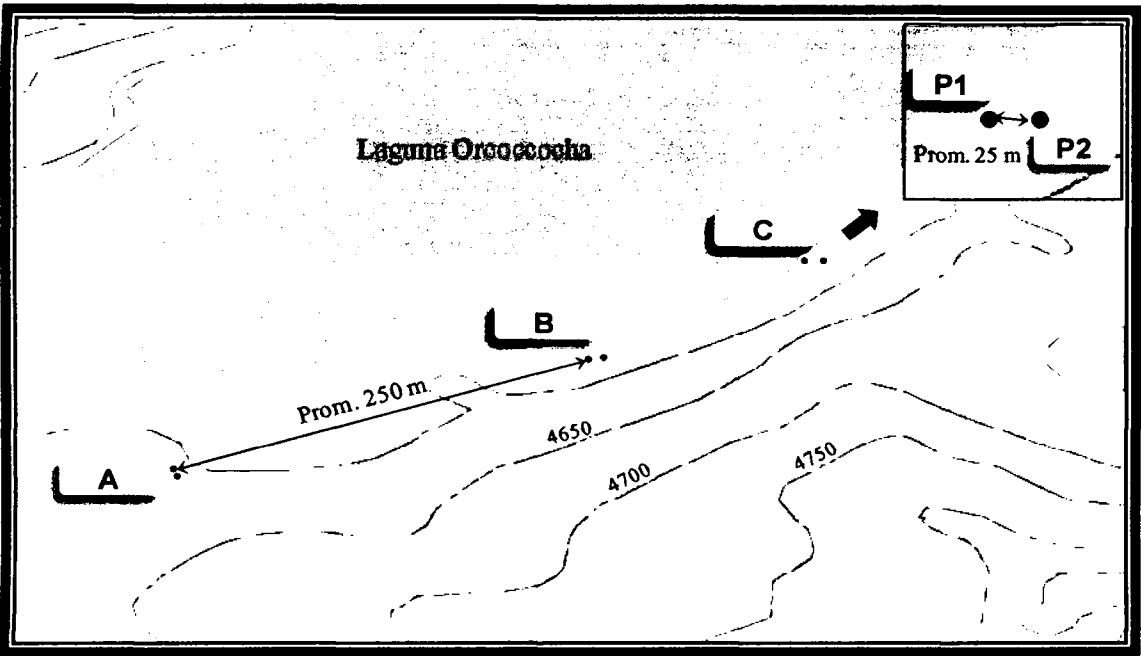


Figura 2-4. Recolección de especies forrajeras nativas, en la zona de Santa Inés. Sitios de Recolección (A, B y C). N° de Plantas (P1 y P2).

2.3.3. Preparación de muestras para su traslado

Las plantas de pastos recolectados, se cortaron las raíces y tallos, luego fueron envueltos en papel periódico y atado con hilos pabilo. En el extremo del hilo se colocaron las etiquetas de masking con los códigos de identificación

correspondientes. Después de humedecer el papel, que envuelve la muestra, se embolsaron para ser puestas en el cooler y ser trasladada a la Estación Experimental Agraria La Molina INIA-Lima (Figura 2-5).



Figura 2-5. Muestras de pastos nativos preparados para su traslado, con sus respectivos códigos de identificación.

2.4. Trasplante de colectas de especies forrajeras nativas

Con la finalidad de obtener partes vegetales tiernas de la planta (hojas, vaina o tallo) para la extracción de ADN, las colectas fueron trasplantadas y mantenidas en invernadero de la Subdirección de Recursos Genéticos y Biotecnología del INIA-La Molina (Figura 2-6).

Preparación del sustrato y llenado de bolsas

La preparación del sustrato y el llenado de bolsas fueron realizados anticipadamente a la recolección de las muestras. El sustrato consistió en la mezcla de arena desinfectada y compost; preparadas en bolsas de polietileno (30 x 25.5 cm) de vivero.

Trasplante de plantas de pastos nativos recolectadas

Las muestras fueron retiradas cuidadosamente del cooler una por una e inmediatamente se les trasplantó en las bolsas y el etiquetado correspondiente con la codificación de campo.

Cuidados de las muestras

Los cuidados correspondientes, se encaminaron a obtener brotes tiernos para iniciar los trabajos de extracción de ADN. Se realizó la poda al ras de la corona, el riego controlado, fertilización, aplicación de abonos foliares, deshierbo constantes, remoción del sustrato.

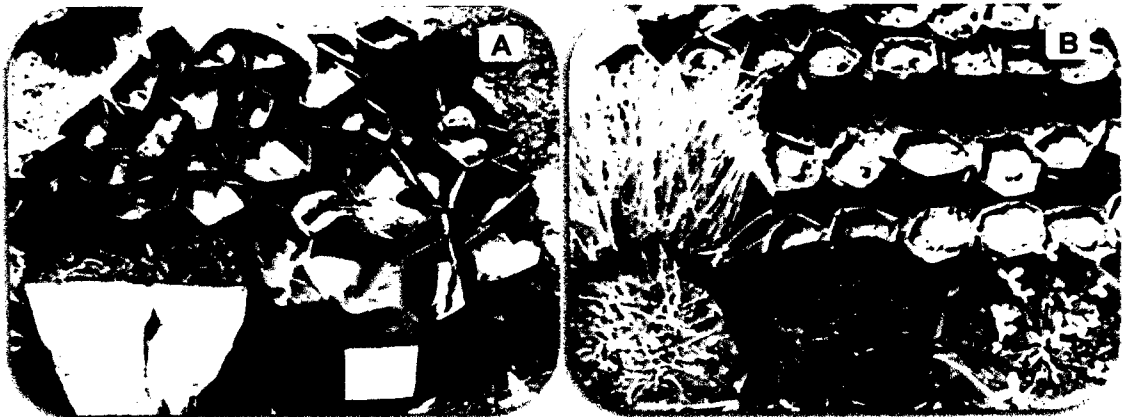


Figura 2-6. Obtención de partes tiernas de pastos nativos altoandinos. A). Trasplante de muestras colectadas. Y B) Rebrote de las 4 especies forrajeras nativas.

2.5. Identificación de marcadores AFLP

La identificación de marcadores AFLP y la obtención de datos para el análisis de diversidad genética y distribución espacial de las colectas de las especies forrajeras altoandinas (*Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile*), presentó el siguiente proceso de análisis que se detalla a continuación.

2.5.1. Extracción de ADN de especies forrajeras nativas

El ADN nuclear fue obtenido a partir de toda la parte aérea de la planta (hoja, vaina, ligula, tallo), mediante el protocolo estandarizado para pastos a partir del método CTAB (CIP, 1997) modificado en el Laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB-INIA (**Figura 2-7**). Este método consta de 5 etapas fundamentales.

- a. La extracción de ADN, se inició con el traslado de plantas con brotes tiernas del invernadero al área de extracción del Laboratorio. Las hojas, vainas y tallos debidamente desinfectados con alcohol de 96°, se procedió a cortarlas y colocarlas en el mortero al cual se le agregó nitrógeno líquido (desecante), para que se realice la ruptura mecánica de las paredes y membranas celulares.
- b. Como resultado del paso anterior se obtuvo un polvo fino, el cual se trasvasó a tubos de microcentrífuga para la incubación del tejido a 65°C en 700 µl del tampón de extracción CTAB 2X y 2 µl de β-mercaptoetanol. El CTAB solubiliza las membranas lipoproteicas, denatura las enzimas

degradativas del ADN y forma un complejo con el ADN y el β -mercaptoetanol (protege al ADN de la actividad de las enzimas como las peroxidases y polifenoloxidasas).

- c. Luego de la incubación, se agregó a la suspensión 700 μ l de cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1), el cual elimina los polisacáridos, lípidos y proteínas a través de la centrifugación. Después se adiciona 50 μ l de la solución tampón CTAB 10X con NaCl, 300 μ l de acetato de potasio y nuevamente 700 μ l de cloroformo/alcohol-isoamílico (24:1).
- d. Al sobrenadante se añadió 700 μ l de isopropanol frío, para precipitar los ácidos nucleicos haciéndose visible el ADN ("pellet") en refrigeración por 2 minutos a -20°C , el cual es sedimentado por centrifugación; cuarta etapa.
- e. En la quinta etapa el pellet (ADN/ARN) es lavado 2 veces con etanol 70% y una vez con etanol absoluto. Luego de los lavados el precipitado se dejó secar toda la noche colocando los tubos de microcentrífuga abiertos e inclinados.

Finalmente, el precipitado se resuspendió en buffer $T_{10}E_{0.1}$ y se agrega 1 μ l de ARNasa 10 mg/ml para degradar el ARN por incubación por 2 horas a 37°C , y así obtener sólo el ADN deseado.

La extracción de ADN de las especies forrajeras nativas presenta un detalle particular frente a otras especies vegetales, debido a que se realizó con dos repeticiones por muestra (dos tubos de 2 ml, por cada repetición) para

llegar a obtener la cantidad y calidad de ADN que se requiere en los análisis de AFLP. Además, al agregar el tampón de extracción CTAB 2X se incubó inmediatamente en baño maría a 65°C (Anexo 3 y 8).

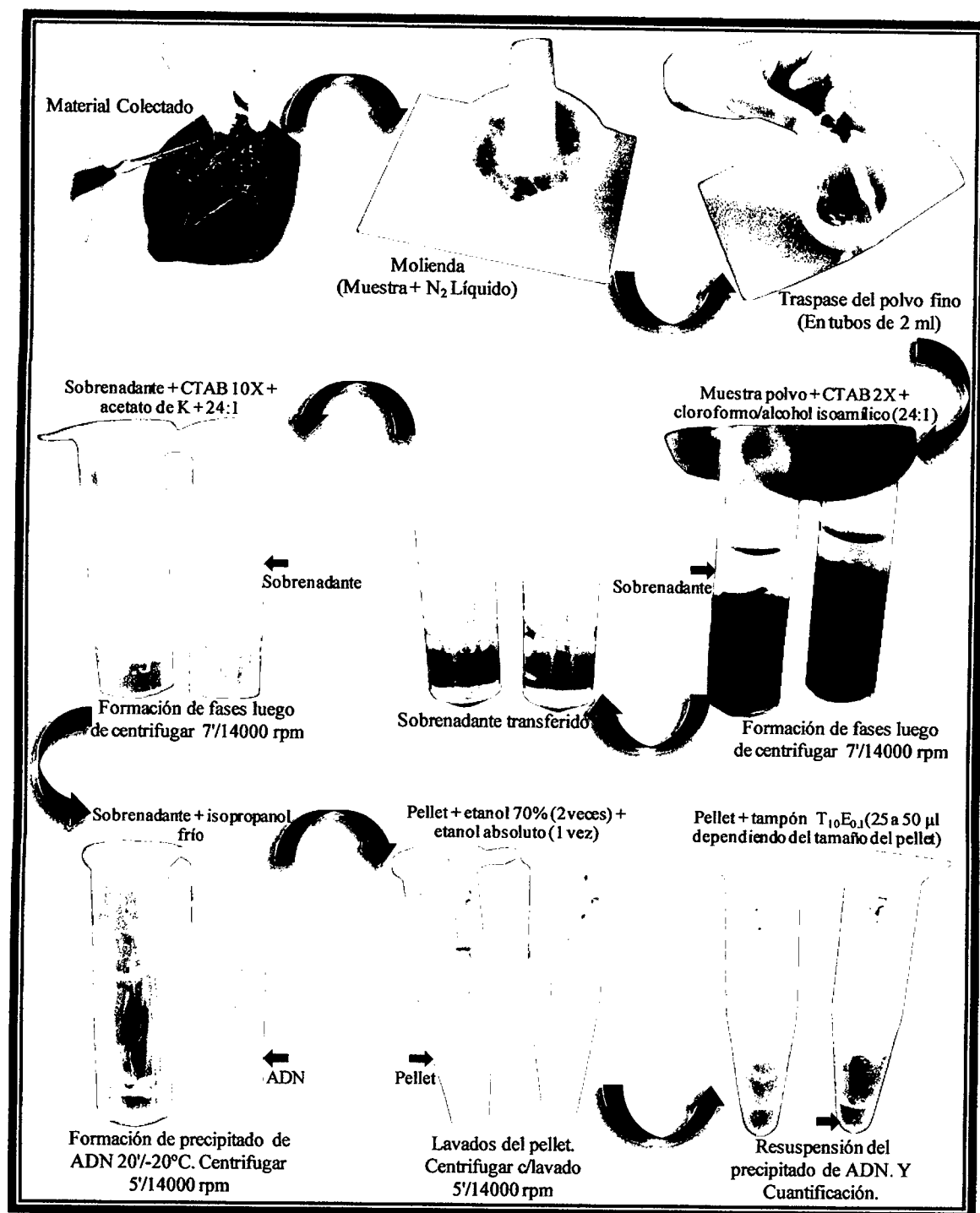


Figura 2-7. Diagrama esquemático del método de extracción de ADN genómico de las especies forrajeras alto andinas.

2.5.2. Evaluación del ADN aislado

Es requisito esencial, que el ADN aislado esté libre de contaminantes como ARN, fenol, cloroformo, etanol, sales, detergentes, EDTA, etc., los cuales afectarían en el momento de la amplificación por PCR, por ello es importante la verificación de la calidad y la cantidad de ADN extraído. Esta operación se realizó a través de dos métodos.

Electroforesis horizontal en gel de agarosa

En este procedimiento, se preparó geles de agarosa al 1% en 100 ml de TBE 1X y fue disuelta en microondas por 3 minutos. Ya disuelto, se agregó 2.5 µl de bromuro de etidio y se vertió en un molde, luego se colocó los peines para formar lo pocillos.

Se mezcló 2 µl de ADN extraído con 4 µl de tampón de carga SALB 2X (azul de bromofenol, sucrosa, xilencianol, naranja G), el cual tiene la finalidad de incrementar la densidad de las muestras para asegurar que el ADN sea depositado uniformemente en el pozo, asimismo da color a la muestra lo que no solo facilita el cargado, sino también sirve como un patrón de corrida referencial debido a los colores visibles durante la corrida.

El gel con el molde se colocó en la cámara electroforética horizontal conteniendo buffer de corrida TBE 1X, inmediatamente se cargó 6 µl de la mezcla del ADN con SALB 2X en cada pozo formado por los peines, que fueron retirados con anterioridad, y en el último pozo se cargó 2 µl del marcador de peso molecular y concentración conocido, ADN del fago lambda cortado por la enzima PstI. Seguidamente, se llevó a cabo la electroforesis a 100 voltios por 45 minutos aproximadamente.

El ADN en el gel de agarosa, teñido con bromuro de etidio, fue visualizado con luz UV a través del transiluminador y fotografiado con el captador de imágenes digitales (**Anexo 4 y 9**). El colorante mencionado tiene la propiedad de intercalarse con el ADN de doble hélice, y la intensidad de fluorescencia inducida por la luz UV, es proporcional a la cantidad de ADN.

La cantidad aproximada de ADN se estimó comparando la intensidad y grosor de cada una de las bandas con la primera banda del marcador fago lambda, la cual es equivalente a 28 ng/μl, para luego llevarlas a una concentración uniforme de aproximadamente 25 ng/μl (**Figura 2-9**). Conociendo la concentración aproximada de ADN (ng/μl) de las muestras, seguidamente se calculó la concentración en el volumen total de los respectivos tubos con las muestras con la siguiente fórmula:

$$C_i \times V_i = C_f \times V_f$$

C_i : Concentración inicial del soluto.

V_i : Volumen inicial de la solución.

C_f : Concentración final del soluto.

V_f : Volumen final de la solución.

Método Qubit™ Fluorometer

El método se aplicó para determinar la cantidad de ADN de las muestras de pastos. Como primer paso se preparó las muestras de ADN con buffer (especificación 199 μl para c/u) y el fluoróculo (especificación 1 μl para c/u). El volumen total de la preparación de los reactivos, dependía del número de muestras a ser cuantificadas.

El cálculo de la concentración de ADN de las muestras, se realizó con la siguiente relación:

$$[\text{ADN}] = \frac{(\text{lectura Qubit}) * 200}{\text{dilution}}$$

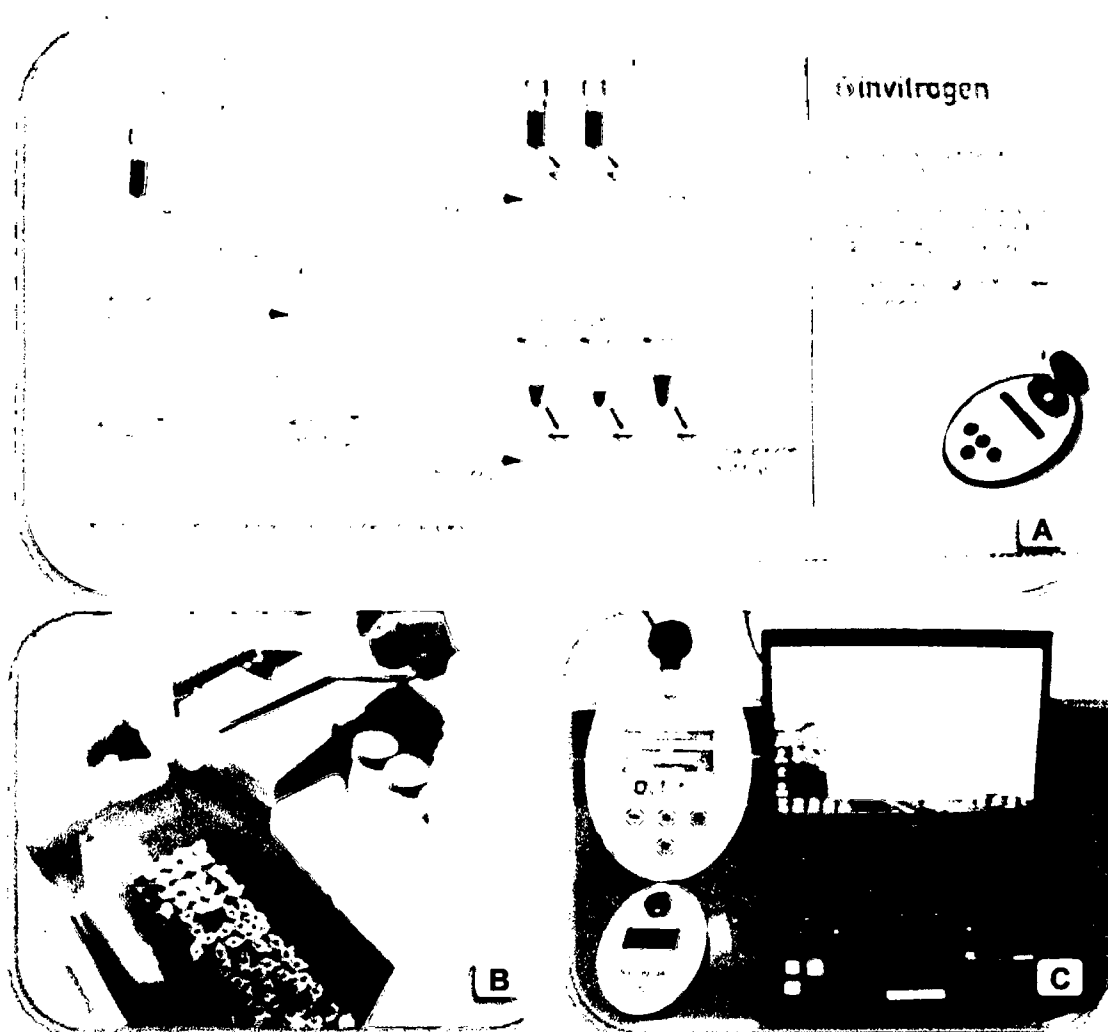


Figura 2-8. Método Qubit Fluorometer para cuantificar el ADN de las especies forrajeras nativas altoandinos. A) Diagrama esquemático del procedimiento. B) Preparación de muestras y soluciones. Y C) Lectura en el Qubit.

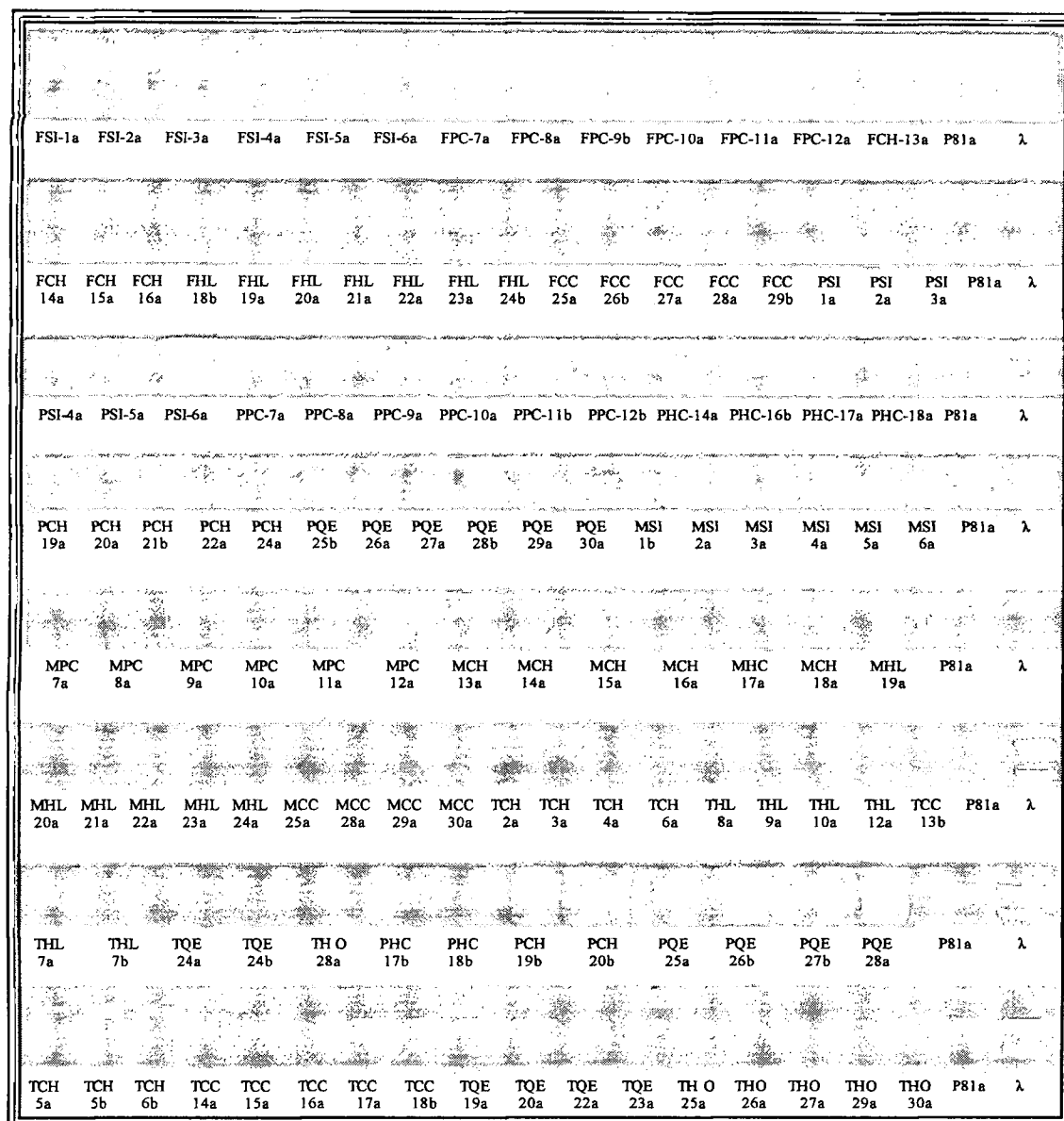


Figura 2-9. Bandas de ADN (25 ng/μl) de las especies forrajeras nativas, evaluadas mediante electroforesis en gel de agarosa 1%. (λ) Lambda ADN (56 ng).

2.5.3. Amplificación de fragmentos AFLP

Para la amplificación se realizó los diferentes preparados de reacción. Se obtuvo segmentos de ADN de distintos tamaños, mediante el empleo de las llamadas “tijeras moleculares” (enzimas de restricción). Luego, se ha realizado muchas copias de estos fragmentos para poder tener una cantidad observable a simple vista, esto se logró mediante la PCR, con la cual, al igual que en una

fotocopiadora se generaron millones de copias de los fragmentos de ADN. De esta manera, los fragmentos estuvieron listos para ser separados por sus respectivos tamaños al hacerlos correr electroforéticamente por un gel; y ser teñidas con nitrato de plata y así poder visualizarlos como bandas oscuras.

Selección de iniciadores

Para la amplificación de los marcadores moleculares AFLP se utilizó 6 combinaciones de iniciadores. Lo oligonucleótidos fueron tomados como referencia de Morales *et al* (2006) y CIP (1997), los cuales mostraron polimorfismo en estudios previos de especies forrajeras nativas (Tabla 2-5).

Tabla 2-5. Iniciadores seleccionados con base en las secuencias de *Eco* RI y *Mse* I, para la amplificación de marcadores AFLP de las especies de pastos nativos altoandinos (*Festuca dolichophylla* , *Poa perligulata* , *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile*).

AFLP locus	Iniciadores con base en las secuencias de <i>Eco</i> RI (E) y <i>Mse</i> I (M)	Forma simplificada
E35	5-GAC TGC GTA CCA ATT C/AC A-3	<i>Eco</i> RI-ACA
E41	5-GAC TGC GTA CCA ATT C/AG G-3	<i>Eco</i> RI-AGG
M48	5-GAT GAG TCC TGA GTA A/CA C-3	<i>Mse</i> I-CAC
M55	5-GAT GAG TCC TGA GTA A/CG A-3	<i>Mse</i> I-CGA
M57	5-GAT GAG TCC TGA GTA A/CG G-3	<i>Mse</i> I-CGG
M59	5-GAT GAG TCC TGA GTA A/CT A-3	<i>Mse</i> I-CTA
M60	5-GAT GAG TCC TGA GTA A/CT G-3	<i>Mse</i> I-CTG

Primers de la publicación Morales *et al* (2006) y CIP (1997).

Procedimiento AFLP

La guía referencial del procedimiento, de acuerdo a las condiciones del Laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB-INIA, fue elaborada tomando como referencia los protocolos descritos en Molecular Biology

Laboratory Protocols: Plant Genotyping (CIP, 1997). La técnica fue repetida 2 veces para verificar la reproducibilidad de los marcadores. Consta de 4 etapas:

a. Digestión

Etapa en la cual se utilizó 100 ng de ADN con la adición de una enzima de corte raro (*EcoRI*) combinada con otra enzima de corte frecuente (*MseI*), con la finalidad de fraccionar el ADN en segmentos de distintos tamaños. En efecto, con esta digestión se generaron tres clases de fragmentos que difieren en cuanto a las extremidades, así se obtuvo fragmentos grandes resultantes de la digestión por la enzima de corte raro, fragmentos pequeños resultantes de la enzima de corte frecuente y fragmentos de tamaños intermedios resultantes del corte combinado de ambas enzimas (Tabla 2-6).

Tabla 2-6. Protocolo del proceso de Digestión del ADN genómico de las especies forrajeras nativas con enzimas de restricción (*Mse I/Eco RI*).

Componentes	Concentración Stock	Concentración Final	1 Reacción (µl)
Buffer 5X R-L			4
NaCl	0.5 M	0.1 M	2
BSA	10 mg/ml	0.2 mg	0.2
<i>MseI</i>	5 U/µl	0.15 U	0.3
<i>Eco RI</i>	10 U/µl	0.25 U	0.25
NFW			3.25
Vol Total			10

10 µl Mix Digestión + 100 ng ADN (3 horas a 37°C).

Luego, se agregó 10 µl de la mezcla de digestión en 4 µl de ADN de los pastos a concentración de 25 ng/µl, en placas de 96 pocillos. Se incubó a 37°C por 3 horas en un termociclador MJ Research de modelos PTC 100 y PTC 200.

b. Ligación

Para incorporar los adaptadores específicos que poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción, se preparó la mezcla de ligación (Tabla 2-7).

A 10 µl del producto digerido de cada muestra de ADN se agregó 10 µl de la mezcla de ligación y se realizó a temperatura ambiente por 16 horas, con el fin de obtener una reacción completa en placas de 48 pocillos.

Tabla 2-7. Protocolo del proceso de Ligación de adaptadores (*Mse*/*Eco*) para muestras de ADN-digerido de las especies forrajeras nativas.

Componentes	Concentración Stock	Concentración Final	1 Reacción (µl)
Buffer 5X R-L			2
NaCl	0.5 M	0.05 M	1
BSA	10 mg/ml	0.1 mg	0.1
Mse	5 µM	0.5 µM	1
Eco	5 µM	0.5 µM	1
T4 Ligasa	5 U/µl	0.017 U	0.034
ATP	10 mM	1 mM	1
NFW			3.866
Vol Total			10

10 µl Mix de Ligación + 10 µl Digestión (16 horas a T° ambiente).

c. Preselectiva

Se preparó la mezcla de reacción para las muestra de ADN digerido-ligado, de acuerdo al protocolo de preselectiva estandarizado (Tabla 2-8). Esta mezcla contiene iniciadores, los que a partir de los adaptadores amplificaron fragmentos selectivos.

5 µl del producto digerido-Ligado de las muestras de ADN fueron colocadas en placas de 48 pocillos; a éstos se agregó 20 µl de la mezcla

preselectivo. La solución preparada fue amplificada en termociclador MJ Research modelo PTC 200 (Figura 2-10) con el programa estandarizado, protocolo de la **Tabla 2-9**.

Tabla 2-8. Protocolo del proceso de Amplificación Preselectiva para muestras de ADN digerido-Ligado de las especies forrajeras nativas, con primers (Mse 00/Eco 00).

Componentes	Concentración Stock	Concentración Final	1 Reacción (µl)
NFW			14.15
Buffer 10X	10X	1.25X	2.5
dNTPs Mix	5 mM	0.3125 mM	1.25
Eco 00	50 ng/µl	2.5 ng	1
Mse 00	50 ng/µl	2.5 ng	1
Taq	5 U/µl	0.025 U	0.1
Vol Total			20

20 µl Mix Preselectiva + 5 µl Producto Dig-Lig.

Tabla 2-9. Programa de amplificación preselectiva para marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	4 min
13	94	30 seg
	65	30 seg
	-0.7° x ciclo	
	72	1 min
24	94	30 seg
	56	30 seg
	72	1 min
1	72	5 min
1	4	2 min

De la tabla anterior, las condiciones de amplificación fueron; un primer ciclo de denaturación previa a 94°C por 4 minutos. La siguiente etapa consta de 13 ciclos, cada uno con tres subetapas; la primera la denaturación a 94°C por 30 segundos para separar las hebras del ADN molde y del iniciador; segundo el alineamiento de los iniciadores al ADN molde a 65°C y -0.7°C por ciclo (temperatura de unión ó annealing) por 30 segundos; y la tercera, la extensión a 72°C por 1 minuto, para que la taq polimerasa realice la síntesis en presencia de dNTPS y MgCl₂. Otra etapa que consta de 24 ciclos, e igual al anterior, con sus tres subetapas respectivas con la diferencia en que el alineamiento de los iniciadores de ADN es a 56°C por 30 segundos. Y finalmente, dos ciclos más, una de 72°C por 5 minutos y la otra a 4°C por 2 minutos.

d. Selectiva

Etapa de mayor intensidad de selección de fragmentos de ADN, la combinación de los primers o iniciadores utilizados en la mezcla contienen tres nucleótidos arbitrarios adicionales, entonces solamente 3 de cada 4 bases posibles intervinieron en la producción de fragmentos amplificados.

Para esta etapa, se realizó la dilución de los productos preseleccionados en 1:1 (ADN pre amplificado y agua libre de nucleasas) y se preparó la mezcla de reacción para una muestra de ADN de la preselectiva diluida, de acuerdo al protocolo selectivo estandarizado (**Tabla 2-10**).

De las diluciones del producto preselectivo diluido se tomó 5 µl y se les agregó los 5 µl de la mezcla selectiva para la amplificación en termociclador MJ Research modelo PTC 100 (**Figura 2-10**) con el programa estandarizado,

protocolo de la **Tabla 2-11**. Dicha tabla muestra las condiciones del programa de amplificación selectiva similar a la etapa de amplificación preselectiva. El número de ciclos, las temperaturas y los tiempos presentan valores diferentes al programa de amplificación preselectiva, siendo el principio lo mismo. Se realizaron las amplificaciones con 6 combinaciones de iniciadores de marcadores AFLP (**Tabla 2-12**).

Tabla 2-10. Protocolo del proceso de Amplificacion Selectiva para muestras de ADN de la Preselectiva diluida de las especies forrajeras nativas, con la combinación de iniciadores o primers seleccionados.

Componentes	Concentración Stock	Concentración Final	1 Reacción (µl)
NFW			0.84
Buffer 10X	10X	2.2X	1.1
dNTPs 5mM	5mM	0.6 mM	0.6
Eco + 3	50 ng/µl	20 ng	2
Mse + 3	50 ng/µl	3 ng	0.3
Taq	5U/µl	0.16 U	0.16
Vol Total			5

5 µl Mix Selectiva + 5 µl Preselectiva diluida.

Tabla 2-11. Programa de amplificación selectiva para marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.

Ciclos	Temperatura (°C)	Tiempo
1	94	2 min
11	94	20 seg
	66	30 seg
	-1° to 56°	
	72	2 min
20	94	20 seg
	56	30 seg
	72	2 min
1	60	30 min
1	4	2 min

Tabla 2-12. Combinación de iniciadores para la amplificación de marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas.

AFLP loci	Combinación de iniciadores para la amplificación AFLP
E35-M48	<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CAC
E35-M55	<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGA
E35-M57	<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGG
E41-M57	<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CGG
E41-M59	<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTA
E41-M60	<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTG

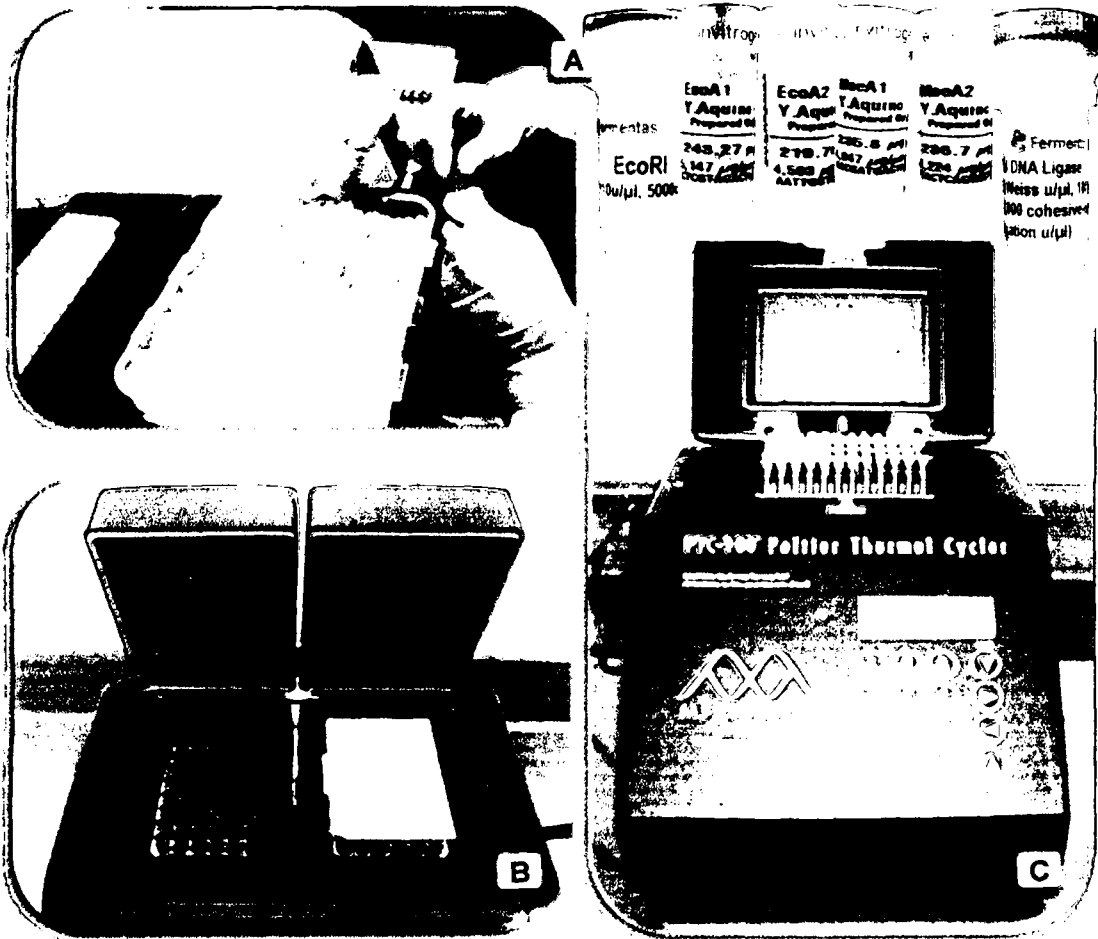


Figura 2-10. Amplificación de fragmentos AFLP de pastos nativos altoandinos, mediante PCR. A) Conjunto de reactivos utilizados en los procedimientos de las etapas del AFLP. B) Termociclador PTC 200 de dos cabezales para amplificación de 48 muestras c/uno. Y C) Termociclador PTC 100 un cabezal para amplificación de 96 muestras.

2.5.4. Electroforesis de los productos de amplificación

La electroforesis de los productos de PCR se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida (Acrilamida al 6%, Urea 7M), en una cámara vertical para geles de secuenciamiento (Gibco, Modelo S2 y CBS dual). La cámara consta de los siguientes componentes: dos tanques de electroforesis, (ánodo y cátodo), en los cuales se coloca el buffer de electroforesis; una base o soporte que mantiene fijo todo el sistema; la placa de aluminio sobre la cual se apoyan los vidrios; dos vidrios de igual grosor y anchura, pero de diferente altura, el menor es denominado “vidrio adhesivo” sobre el cual deberá quedar adherido el gel una vez polimerizado, el otro más alto denominado “vidrio repelente”, el cual no participa en el procedimiento de la tinción; los espaciadores de polietileno o teflón, que son los que van a definir el grosor del gel; y el peine del mismo grosor y material de los espaciadores que va a permitir moldear los pocillos para colocar las muestras.

El funcionamiento del sistema de electroforesis, presentó los siguientes pasos:

a. Preparación del gel de poliacrilamida

Se limpiaron las placas de vidrio con alcohol y papel toalla antes de aplicar los respectivos reactivos. Al vidrio de menor altura, se le impregnó la solución adherente compuesta por 1.5 ml de alcohol 96%, 4.7 µl ácido acético glacial y 5 µl de silano adhesivo (p-metacriloxipropil trimetoxi silano). Una parte del silano adhesivo, interactúa con la placa de vidrio y la otra parte polimeriza con el gel, lo que permite la adhesión del gel al vidrio. El otro vidrio fue tratado

con 1 ml de dimethyldiclorosilan, aproximadamente, para impedir la adhesión al gel.

Luego de 30 minutos los vidrios fueron ensamblados con los separadores y sujetadores. Al molde resultante similar a un “sándwich”, inmediatamente, se vertió la solución de poliacrilamida; éste consiste en 60 ml de solución de acrilamida al 6%-úrea 7 M, 360 μ l de APS al 10% y 36 μ l de TEMED, a continuación se colocaron los respectivos peines. Para que el gel pueda ser usado, se esperó un tiempo mínimo de 2 h para su polimerización (**Anexo 5**).

b. Instalación y pre electroforesis del gel

Luego de la polimerización, el molde con el gel fue colocado en la cámara de electroforesis vertical, sin los sujetadores y libre de residuos de poliacrilamida. En seguida se vertió 500 ml, aproximadamente, de tampón TBE 0.5X en los compartimientos inferior y superior. Luego se hizo una precorrida a 1500 voltios por 30 minutos (**Anexo 6**).

c. Denaturación

Las muestras de ADN amplificadas, fueron denaturadas a 95°C por 5 minutos, antes de ser cargadas en el gel, pero previamente se les añadió el tampón de carga para geles de poliacrilamida (50% del volumen de la muestra) con la finalidad de darle mayor densidad a la muestra, estabilizar las condiciones denaturantes por medio de la formamida al 96% y contar con un patrón de colores como referencia de peso molecular. El azul del xilencianol, en acrilamida al 6%, corresponde a 110 pb.

d. Cargado y corrida electroforética de la muestra

Se cargaron 7 μ l del producto amplificado y denaturado. El tiempo de corrida promedio fue de 3 horas a 1500 voltios, 100 watts y 100 mA. El tiempo de corrida varió de acuerdo a la combinación de iniciadores para facilitar la identificación y determinación del tamaño de la bandas (**Anexo 6**).

2.5.5. Tinción del gel de poliacrilamida para revelar bandas amplificadas

Para visualizar las bandas amplificadas, se utilizó un protocolo de tinción no radioactiva, con nitrato de plata y revelado con carbonato de sodio (**Anexo 7**); con el siguiente procedimiento:

a. Fijación

Terminada la electroforesis el vidrio adherente fue separado del vidrio repelente para ser sumergido en una solución fría de ácido acético al 10% en agitación durante 30 minutos. La fijación es un paso que evita la difusión de las moléculas de ácido nucleico separadas en la matriz del gel, también ayuda a remover y neutralizar químicos indeseados (como úrea, tampón de corrida).

b. Lavado post fijación

Seguidamente, el gel fue lavado dos veces con agua destilada helada, en agitación, durante 4 minutos cada uno. Este paso remueve remanentes de componentes solubles del gel que se quedan después de la fijación y que interfieren con la tinción.

c. Impregnación de la plata

El gel ya fijado, fue colocado en otra bandeja con la solución fría de nitrato de plata al 0.1% más 1.5 ml de formaldehído al 37%, en agitación durante 30 minutos. En esta etapa, el ión de plata reacciona con las bases del ADN (adenina, guanina, citosina y timina) y la presencia del formaldehído da sensibilidad y contraste; además, este último, probablemente, reduce la plata a un nivel muy bajo pero lo suficiente para producir sitios de nucleación inicial alrededor del sustrato de tinción.

d. Lavado post impregnación

Posteriormente, se procedió a un enjuague con agua destilada fría durante 7 segundos aproximadamente. Este paso permite eliminar remanentes de plata que pueden causar precipitados marrones en la solución durante el revelado. Además, de esta manera, se reduce la concentración de plata en la superficie del gel mejorando el contraste en el revelado, pero enjuagues que exceden los 20 segundos disminuyen la intensidad de las bandas.

e. Revelado

Para el revelado, el gel es sumergido y agitado en una solución reveladora (carbonato de sodio 3%, 750 µl de formaldehído al 37% y entre 10 y 18 µl de tiosulfato de sodio) hasta obtener la intensidad y contraste deseados de las bandas que corresponden a los marcadores AFLP. El revelado se realiza en un medio fuertemente alcalino dado por el carbonato que facilita la reducción de la plata a su estado metálico; la plata reducida se deposita en las proximidades inmediatas a la superficie del gel. El tiosulfato disuelve las sales

de plata insolubles, formando complejos y removiendo los iones de plata de la superficie del gel, permitiendo un teñido más específico.

2.5.6. Registro de marcadores AFLP

Las bandas amplificadas, reproducibles y fáciles de distinguir (bandas escoreables) fueron registradas en una matriz de datos, en hoja de cálculo Excel. Se consideró 1 para la presencia de un marcador AFLP y 0 la ausencia de la misma (**Figura 2-11**).

2.6. Análisis de diversidad genética

Para los análisis bioestadísticos se tomó en cuenta los datos de las 6 combinaciones de iniciadores de las 30 muestras de ADN. El análisis fue realizado dentro de la población y entre poblaciones de las zonas de estudio de los pastizales nativos alto andinos. Se analizaron los datos moleculares obtenidos, con métodos frecuentemente usados en estudios de diversidad genética como la riqueza de marcadores AFLP, proporción de loci polimórficos, diversidad genética de Nei y distancia genética (coeficiente de similitud Jacard).

Previo a los análisis, se realizó la sistematización en la matriz de datos, en hoja de cálculo Excel. Se preparó una nueva matriz de datos en la cual se obvió las bandas monomórficas, es decir aquellas bandas que están presentes en todas las colectas, por lo tanto registran el valor 1 y no permiten detectar diferencias al comparar dos o más colectas. Las bandas polimórficas restantes, que registran 2 valores (1: presencia y 0: ausencia) y permiten diferenciar al comparar las colectas una de la otra, constituyen la matriz básica de datos para los análisis de diversidad genética de Nei, análisis de similitud, agrupamiento.

Por otro lado, el análisis de riqueza de marcadores AFLP y proporción de loci polimórfico involucró las bandas monomórficas y polimórficas.

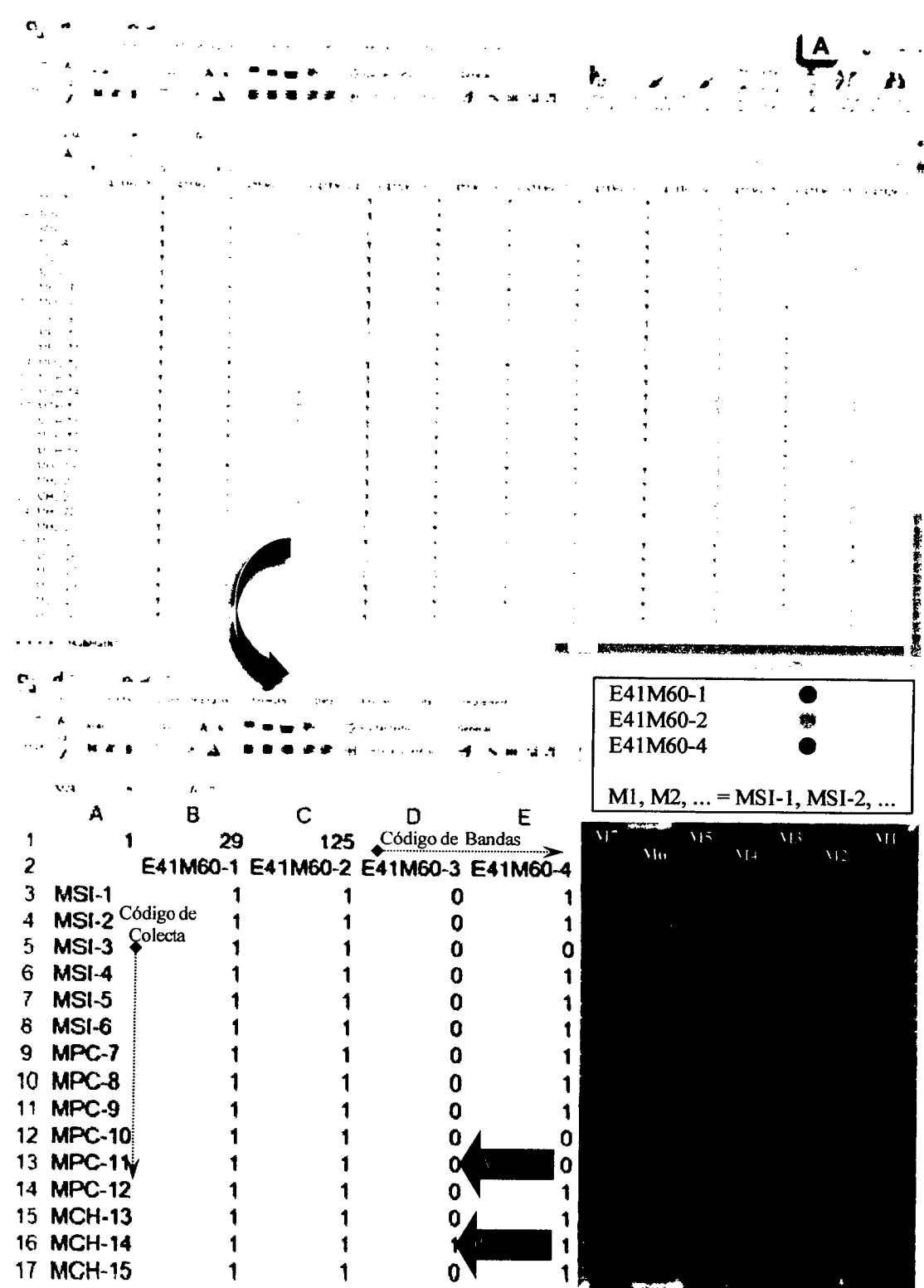


Figura 2-11. Registro de datos de marcadores AFLP de las especies forrajeras nativas altoandinos. A) Matriz básica de datos de presencia (1) y ausencia (0) de bandas.

2.6.1. Riqueza de marcadores AFLP

Se determinó por recuento directo de las bandas presentes en los individuos de la población, para lo cual se utilizó la matriz de datos donde está identificado cada individuo y los marcadores que presenta por locus.

Además, en el análisis por especie de pastos nativos altoandinos, se determinó bandas polimórficas frecuentes, es decir a aquellos que tienen una frecuencia mayor y/o igual al 5% en la población.

2.6.2. Proporción de loci polimórfico (P)

La proporción fue calculada al dividir el número de loci polimórfico entre el número total de loci (polimórficos y monomórficos), con la siguiente relación:

$$P = \frac{n_p}{n_t}$$

Donde,

P : proporción de loci polimórficos.

n_p: el número de loci polimórficos.

n_t: el número total de loci.

2.6.3. Diversidad genética de Nei (h)

Como no se puede estimar la heterocigosidad promedio porque los marcadores dominantes no permiten discriminar entre individuos heterocigotos y homocigotos, se calculó la diversidad genética dentro de un locus (h) para cada locus, utilizando la siguiente fórmula:

$$h_j = 1 - p^2 - q^2$$

Donde,

h_j : diversidad genética promedio.

p y q : frecuencias alélicas.

2.6.4. Similitud genética (coeficiente de similitud Jaccard)

La distancia genética se estimó al transformar la matriz básica de datos en matriz de similitud, utilizando el coeficiente de similitud Jaccard. Se hizo un análisis de agrupamiento, mediante el método de medias aritméticas no ponderadas UPGMA (Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Averages) y se obtuvo el dendograma. Estas operaciones, se realizó mediante el programa NTSYSpc 2.1 (Rohlf, 2000). Además, se realizó lo siguiente:

a. Correlación

Se calculó el coeficiente de correlación (r) entre la matriz de similitud y la matriz cofenética generada en base a la matriz de agrupamiento UPGMA. Valores de " r " menores a 0.7 indican que el dendograma no representaría las relaciones de similitud existentes entre las colectas.

b. Reproducibilidad (bootstrap)

La confiabilidad y persistencia de los grupos formados, se probó mediante bootstrap para probabilidades porcentuales de cada nodo del árbol resultante, con 2000 permutaciones (Felsenstein, 1985), mediante el programa TREECON For Windows 1.3b (Van y Wachter, 1997).

2.7. Análisis y distribución espacial de datos

Se ubicó espacialmente las colectas de las especies forrajeras nativas a través de las coordenadas, con sistemas de información geográfica (SIG), usando el programa DIVA-GIS 5.2 (Hijmans *et al*, 1999). La matriz básica de datos moleculares, más datos de recolección y los clusters formados en el análisis de agrupamiento, fueron importados al programa para realizar la distribución geográfica de la diversidad genética en las zonas de colecta, es decir, se ubicó las zonas geográficas donde se concentra el mayor número de clusters en cuadrículas de 2995.4, 1917.6 y 1078.5 hectáreas. También, se analizó las distancias genéticas entre las colectas ubicándolas en cuadrículas, mediante la distancia de Jaccard (Jaccard, 1908).

CAPITULO III

RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Diversidad genética de las especies forrajeras nativas altoandinas

3.1.1. Riqueza de Marcadores Moleculares AFLP

Las 6 combinaciones de iniciadores por especie amplificaron un total de 1100 bandas escoreables, reproducibles en las 4 especies de pastos nativos altoandinos, de las cuales 575 son bandas informativas o polimórficas y 525 monomórficos. Se obtuvo en promedio 275 bandas escoreables por especie (**Tabla 3-1**).

De las 4 especies forrajeras nativas, *Festuca dolichophylla*, presentó el mayor número de bandas polimórficas con 202 bandas y la especie *Trifolium amabile* presentó el menor número con 93 bandas (**Tabla 3-2 y Figura 3-1**). Es

decir, la mayor diversidad genética de pastos nativos altoandinos le corresponde a la especie *Festuca dolichophylla* y la menor diversidad es para la especie *Trifolium amabile*.

Tabla 3-1. Marcadores AFLP detectados en la población de pastos nativos altoandinos.

Especie	Bandas escoreables	Bandas polimórficas	Bandas monomórficas
<i>Festuca dolichophylla</i>	331	202	129
<i>Poa perligulata</i>	270	155	115
<i>Muhlenbergia ligularis</i>	262	125	137
<i>Trifolium amabile</i>	237	93	144
Total	1100	575	525
Promedio	275	144	131

Tabla 3-2. Marcadores AFLP polimórficas detectadas en las especies forrajeras nativas altoandinas por combinación de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	<i>Festuca dolichophylla</i>	<i>Poa perligulata</i>	<i>Muhlenbergia ligularis</i>	<i>Trifolium amabile</i>
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTG	44	28	29	19
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTA	21	28	15	14
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CGG	29	21	28	14
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGG	21	28	17	20
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGA	46	32	15	14
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CAC	41	18	21	12
Total	202	155	125	93
Promedio	34	26	21	16

Por otra parte, la especie forrajera nativa *Trifolium amabile*, fue el que amplificó el mayor número de bandas monomórficos con 144 bandas y la especie *Poa perligulata* amplificó el menor número con 115 bandas (Tabla 3-3 y Figura 3-1).

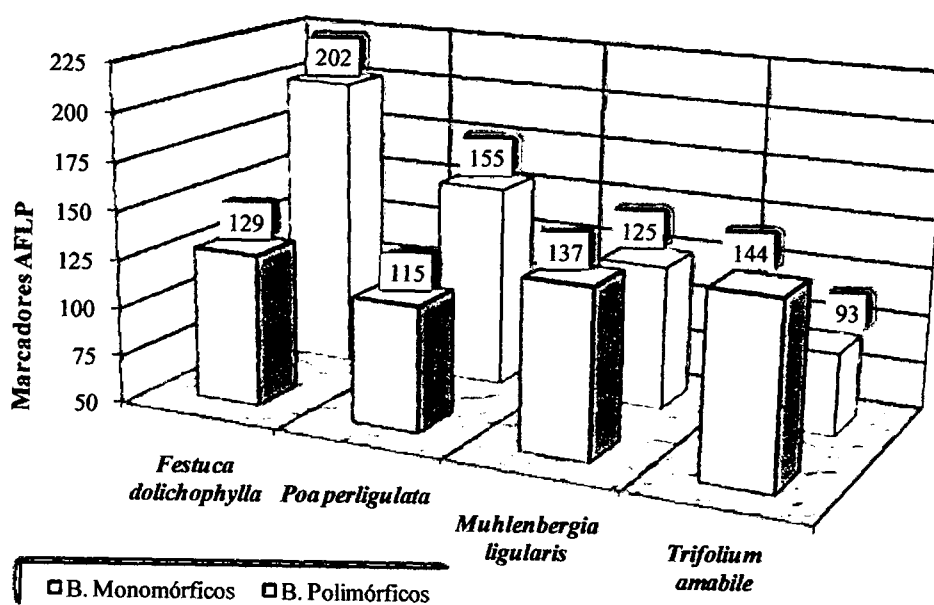


Figura 3-1. Representación esquemática de marcadores AFLP detectadas en las especies forrajeras nativas altoandinos.

Tabla 3-3. Marcadores AFLP monomórficos detectadas en las especies forrajeras nativas altoandinas por combinación de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	<i>Festuca dolichophylla</i>	<i>Poa perligulata</i>	<i>Muhlenbergia ligularis</i>	<i>Trifolium amabile</i>
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTG	21	19	23	28
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTA	29	17	31	21
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CGG	16	23	17	30
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGG	19	15	24	18
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGA	17	20	23	24
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CAC	27	21	19	23
Total	129	115	137	144
Promedio	22	19	23	24

3.2. Diversidad genética de la especie forrajera *Festuca dolichophylla*

3.2.1. Diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética dentro de la población, comprende el análisis de datos de las 30 colectas de *Festuca dolichophylla*, obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores. Considera el estudio de los individuos que conforman las 5 zonas ecológicas para tener una idea aproximada de la diversidad genética en la población total de la especie.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población

Las 6 combinaciones de iniciadores amplificaron 331 marcadores AFLP y 60% fueron polimórficas (Tabla 3-4). El número de fragmentos polimórficos fue de 21 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA con 42% de polimorfismo y 46 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA con 73% de polimorfismo. Las combinaciones *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA aportan más a la detección de polimorfismo (Tabla 3-4). Los fragmentos monomórficos en las combinaciones variaron de 16 a 29 (Tabla 3-3).

Tabla 3-4. Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie *Festuca dolichophylla* con 6 combinaciones de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	(<i>nt</i>)	(<i>np</i>)	(<i>P</i>)	(<i>T</i>)	(%) de polimorf.
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTG	65	44	0.6769	0.2178	67.7
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTA	50	21	0.4200	0.1040	42.0
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CGG	45	29	0.6444	0.1436	64.4
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGG	40	21	0.5250	0.1040	52.5
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGA	63	46	0.7302	0.2277	73.0
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CAC	68	41	0.6029	0.2030	60.3
Total	331	202	3.5995	1.0000	-
Promedio	55	34	0.5999	0.1667	60.0

(*nt*): número total de loci. (*np*): número de loci polimórfico. (*P*): proporción de loci polimórfico. Y (*T*): proporción de marcadores polimórficos de cada primer al polimorfismo total.

b. Diversidad genética en la población

En la población estudiada se halló un promedio de diversidad genética (h) de 0.283, índice que podría ser relativamente bajo. Además, de 202 marcadores polimórficos amplificados, 173 tienen una frecuencia de más del 5% en la población (Tabla 3-5).

Tabla 3-5. Diversidad genética en la población de la especie *Festuca dolichophylla*.

Descripción de loci y diversidad genética	Loci polimórficos
Nº Bandas	202
Nº Bandas Freq. (>= 5%)	173
Promedio (h)	0.283
SE del promedio (h)	0.011

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar

3.2.2. Diversidad genética interpoblacional

La diversidad genética entre las poblaciones de la especie *Festuca dolichophylla*, significó el análisis comparativo de 6 colectas entre 5 zonas ecológicas, utilizando 6 combinaciones de iniciadores.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP

El análisis manifiesta que el mayor número de marcadores AFLP fue 143 para Pultocc Chico y el menor fue 117 para Santa Inés (Tabla 3-6).

b. Marcadores exclusivos

El análisis, reveló marcadores AFLP exclusivos para cada zona ecológica, que varió de 4 para Ccarhuaccpampa a 13 para Huillcani (Tabla 3-6)

y Figura 3-2). Entonces, el contenido genético en cada zona es diferente una de la otra, siendo la población de Huilcani más diferenciada de las otras.

Tabla 3-6. Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas alto andinas, de la especie *Festuca dolichophylla*.

Descripción de loci y diversidad genética	Zonas ecológicas de las colectas					Prom. (h)
	Santa Inés	Pultocc Chico	Carhuanchu	Huilcani	Ccarhuaccampa	
Nº bandas	117	143	133	140	142	135
Nº bandas Freq. (>= 5%)	117	143	133	140	142	135
Nº bandas exclusivas	6	8	7	13	4	8
Promedio (h)	0.177	0.225	0.215	0.237	0.215	0.214
SE del promedio (h)	0.014	0.013	0.014	0.014	0.014	0.014

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar.

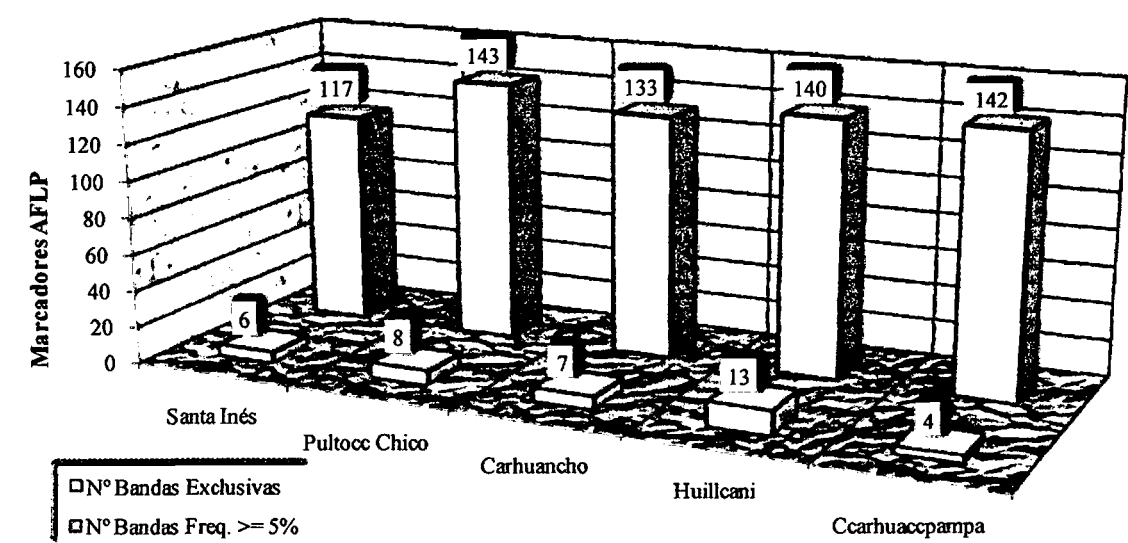


Figura 3-2. Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Festuca dolichophylla*.

En Santa Inés, el número de marcadores exclusivos fue 6 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.167 y 0.50. En Pultoc Chico fue 8 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.167 y 0.333. En Carhuanchu, fue 7 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA +

MseI-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.167 y 0.333. En cambio, en Huilcani el mayor número de marcadores exclusivos fue 13 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.167 a 0.333. Por último, en Ccarhuaccpampa el menor número de marcadores exclusivos fue 4 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA con frecuencias de 0.167 y 0.833 (Tabla 3-7). En resumen, los marcadores exclusivos de las poblaciones por zonas ecológicas fueron reveladas con 5 combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC. Por tanto, éstos son los que aportaron más para diferenciar poblaciones en esta especie.

Tabla 3-7. Marcadores exclusivos y sus frecuencias de la poblaciones por zonas ecológicas de la especie *Festuca dolichophylla*.

Nº	Combinaciones de iniciadores	Marcad.	Freq.	Nº	Combinaciones de iniciadores	Marcad.	Freq.
Santa Inés				Carhuanchu			
1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	3	0.167	6	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	46	0.333
2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	4	0.500	7	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	27	0.167
3	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	12	0.167	Huilcani			
4	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	17	0.167	1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	7	0.333
5	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	23	0.167	2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	9	0.333
6	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	40	0.167	3	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	17	0.167
Pultocc Chico				4	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	28	0.167
1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	3	0.333	5	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	5	0.167
2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	16	0.333	6	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	18	0.167
3	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	20	0.167	7	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	9	0.333
4	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	22	0.167	8	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	14	0.167
5	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGG	11	0.167	9	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	27	0.167
6	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGG	16	0.167	10	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	38	0.333
7	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	33	0.167	11	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	42	0.167
8	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	34	0.167	12	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	26	0.167
Carhuanchu				13	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	31	0.167
1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	16	0.167	Ccarhuaccpampa			
2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	20	0.167	1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	12	0.833
3	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CGG	24	0.167	2	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	15	0.167
4	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	4	0.167	3	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	17	0.167
5	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	30	0.167	4	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	26	0.167

c. Diversidad genética entre las poblaciones

En las poblaciones de las zonas ecológicas, se obtuvo en promedio 0.214 de índice de diversidad genética. En general, las poblaciones de todas las zonas muestran índices similares de diversidad genética a excepción de Santa Inés que presenta, relativamente, bajo índice de diversidad (**Tabla 3-6 y Figura 3-3**).

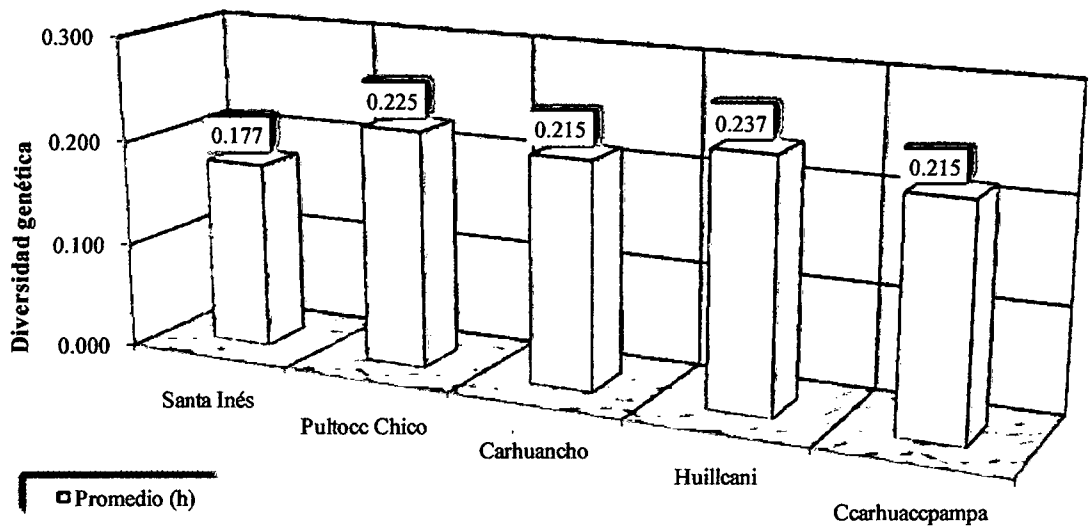


Figura 3-3. Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Festuca dolichophylla*.

3.2.3. Análisis de distancia genética

El conjunto de datos obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores para las 30 muestras de la especie *Festuca dolichophylla*, permitió representar gráficamente a los individuos genéticamente cercanos y observar, relativamente, la diferencia genética entre zonas ecológicas; además, es una referencia de diversidad genética.

a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)

Los índices de similitud genética variaron de 0.337 a 0.594 con un promedio de 0.479, lo cual indica un nivel medio a alto de diversidad genética. Estos índices se obtienen al comparar de par en par las colectas más similares entre sí, tal es así, la colecta FSI-1 es similar a la colecta FSI-4 en 0.585 y ésta a su vez es similar a FSI-2 en 0.544 (Tabla 3-8).

Tabla 3-8. Índices de similitud genética con el coeficiente Jaccard (J), de la especie *Festuca dolichophylla*.

Colectas	Similitud	Colectas	Similitud	Colectas	Similitud
FSI-1	0.585	FPC-7	0.522	FCC-30	0.467
FSI-4	0.544	FPC-12	0.491	FCC-28	0.413
FSI-2	0.485	FPC-8	0.516	FCH-17	0.523
FSI-3	0.557	FPC-9	0.450	FCH-18	0.394
FSI-5	0.515	FPC-11	0.432	FPC-10	0.337
FSI-6	0.457	FHL-20	0.459	FHL-19	0.414
FCH-13	0.444	FCC-25	0.505	FHL-23	0.444
FCH-14	0.495	FCC-26	0.490	FHL-24	0.393
FCH-16	0.464	FCC-27	0.594	FHL-21	0.494
FCH-15	0.428	FCC-29	0.574	FHL-22	-

b. Análisis de Agrupamiento UPGMA

El dendograma (Figura 3-4), muestra grupos que encierran individuos de una misma zona ecológica, por tanto es una referencia de un nivel medio de diversidad genética. Al agruparse por zonas ecológicas, significa que los individuos de una misma zona conservan ciertas características genéticas, en consecuencia cada zona conservaría su propia diversidad. Se observa 11 grupos, de los cuales 4 están formados por una sola colecta (grupos unitarios).

Las poblaciones distintas son de Huilcani y Santa Inés con una diferencia en distancia geográfica de 27 Km y altitud de 4000 y 4650 m.

Además, todos los individuos de Ccarhuaccpampa y Santa Inés se agrupan por separado (grupos 7 y 1) con una distancia de 34 Km y altitud 4100 y 4650 m (Figura 3-4). Por tanto estas colectas serían las que conservan marcadores genéticos propios y las variaciones estarían relacionadas a la distancia geográfica y altitud entre las zonas ecológicas.

Las colectas de Pultocc Chico, Carhuancho y Huillcani se encuentran distribuidas en 3 grupos. Resultado que muestra a estas zonas como de mayor diversidad genética, y por el contrario, Santa Inés y Ccarhuaccpampa, distribuidos en un solo grupo, serían de menor diversidad (Tabla 3-9). En síntesis, las poblaciones de las zonas ecológicas revelaron un nivel medio de diversidad genética para la especie *Festuca dolichophylla*.

Tabla 3-9. Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie *Festuca dolichophylla* .

Grupos	Santa Inés			Pultocc Chico			Carhuanocho			Huillcani			Ccarhuaccp.			Nº de colectas
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
G 1	2	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
G 2	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 3	0	0	0	0	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	0	3
G 4	0	0	0	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	4
G 5	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
G 7	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	6
G 8	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	2
G 9	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	3
G 11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	2
Grupos unitarios	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	30
Grupos por sitio	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	1	0	
Grupos por zona	1			3			3			3			1			

(A, B y C): sitios de recolección.

La representación en el espacio bidimensional no métrico a través de puntos de similitud, obtenido a partir de la matriz de similitud, refleja las distancias entre las colectas de la población de *Festuca dolichophylla* con un coeficiente de stress 0.1484, lo que indica que las interacciones de las distancias entre las colectas de los grupos formados, es bueno (**Figura 3-5**); se observa, que las colectas similares se muestran más cerca y las diferentes más lejos entre sí, ratificando los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA; sin embargo, las colectas FPC-7 y FCC-28 están más distantes frente a las colectas del grupo formado, respectivamente.

c. Coeficiente de Correlación (r)

El alto índice de correlación ($r = 0.805$) obtenido entre la matriz de similitud y la matriz cofenética del agrupamiento nos demuestra que el dendograma representa adecuadamente a las relaciones de similitud genética existente entre las colectas.

d. Reproducibilidad

El análisis de reproducibilidad bootstrap (2000 repeticiones) estableció la conformación de los grupos genéticos. Los grupos 1, 3, 4 y 7 presentaron valores de reproducibilidad entre 1% y 9% (menos consistente); y el grupo 8, 10 y 11 presentó valores entre 22% y 81% de confiabilidad (más consistente).

LEYENDA:

FHL: Festuca de Huilcani
(4000 msnm)

FCC: Festuca de Ccarhuaccp.
(4100 msnm)

FCH: Festuca de Carhuanchu
(4450 msnm)

FSI: Festuca de Santa Inés
(4650 msnm)

FPC: Festuca de Pultoc Chico
(4700 msnm)

G 1, G 2, ..., G11: Grupos

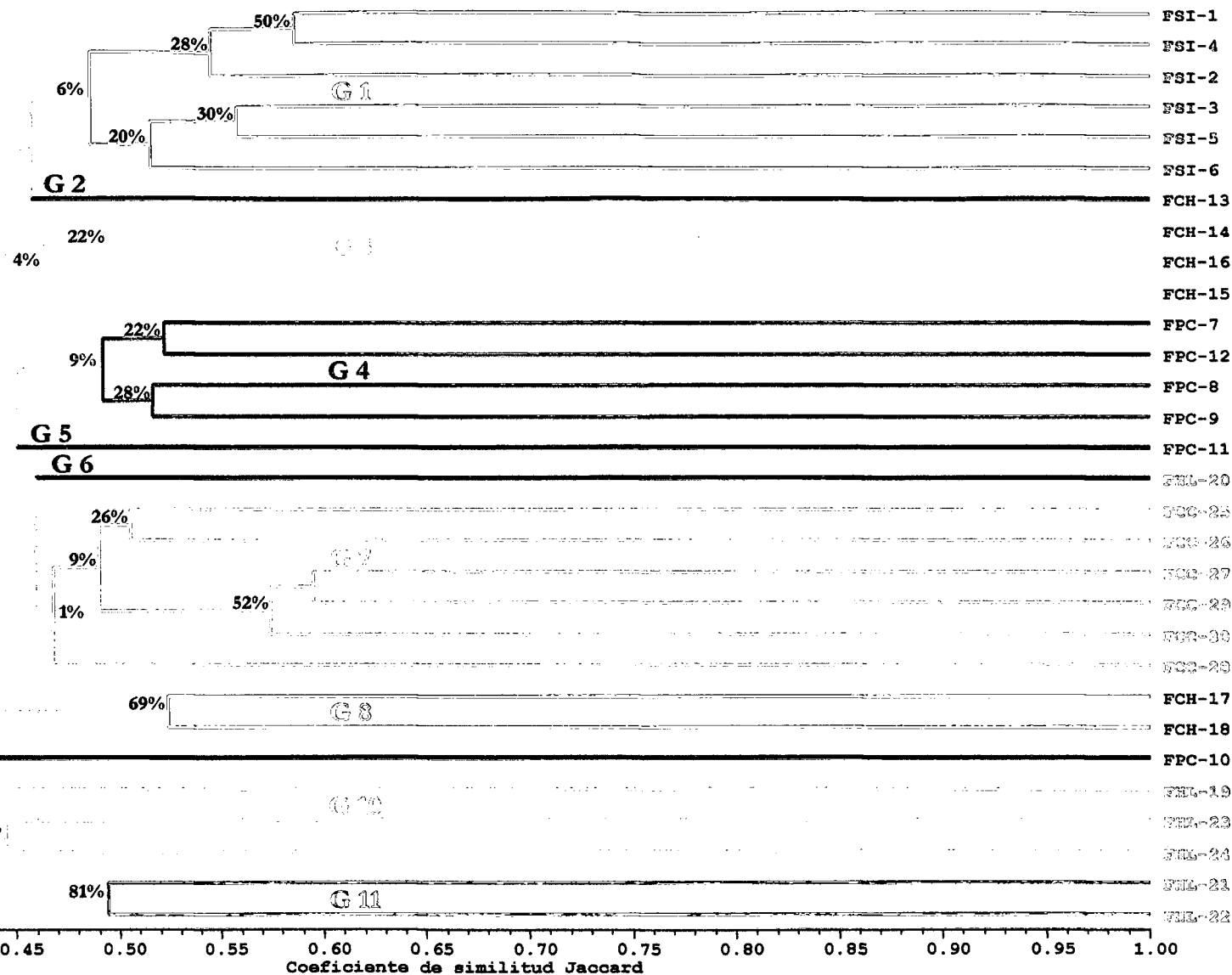


Figura 3-4. Dendrograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa altoandina *Festuca dolichophylla*.

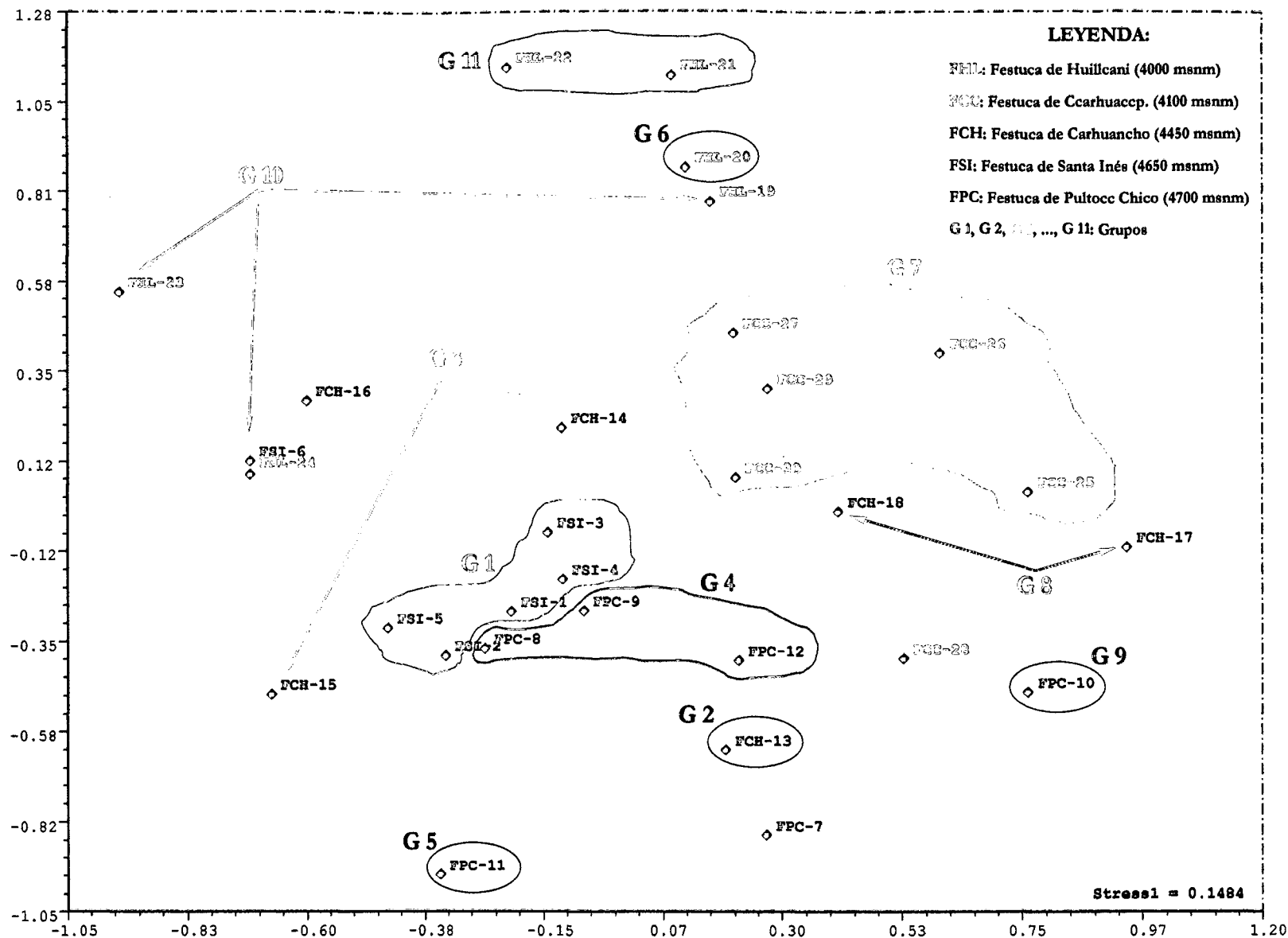


Figura 3-5. Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina *Festuca dolichophylla*.

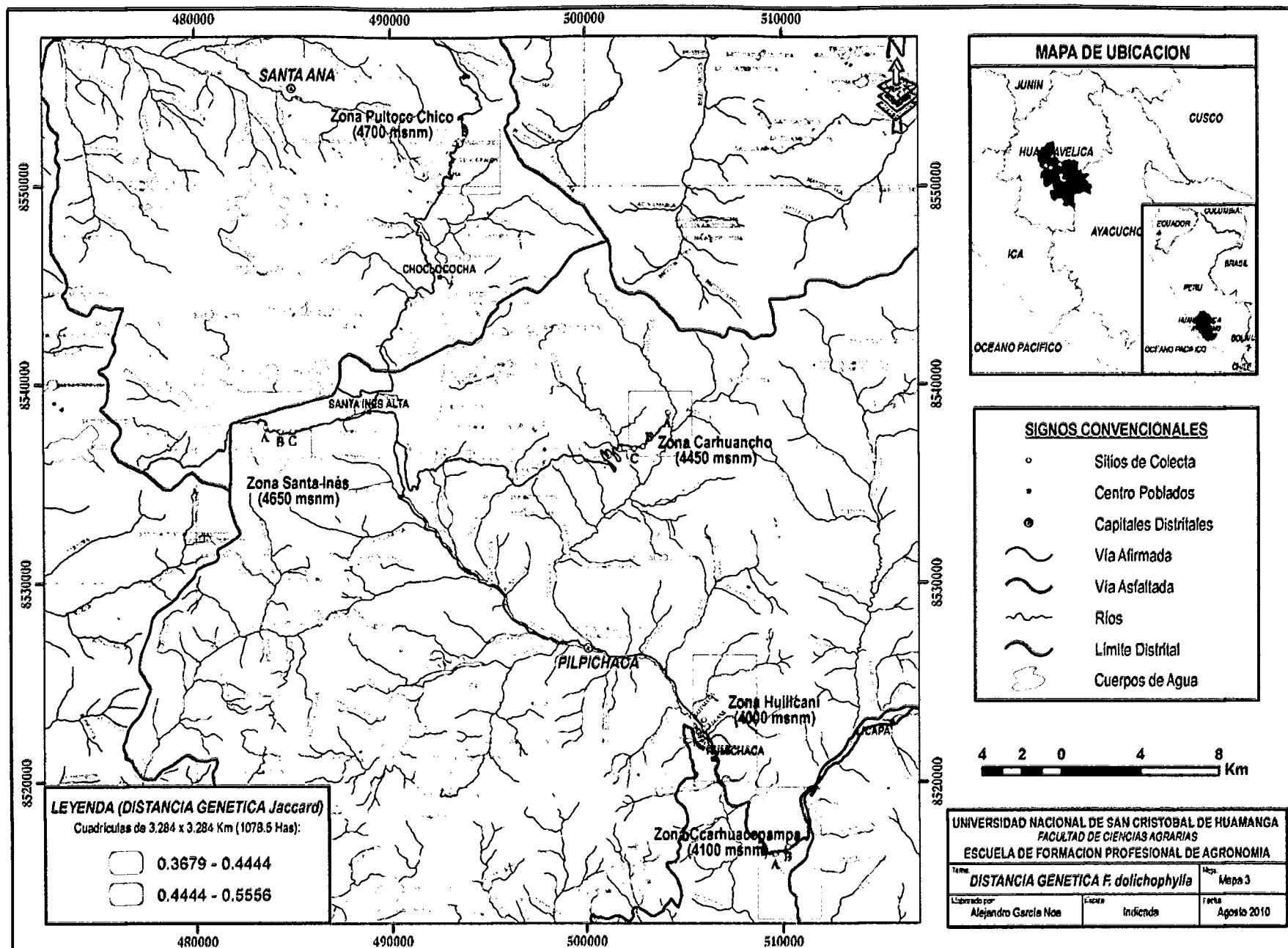
3.2.4. Distribución geográfica

a. Riqueza de grupos

El análisis espacial, mediante el programa DIVA-GIS 5.2 con apoyo del ArcGIS 9.3, ratifica que el mayor número de grupos le corresponden a las colectas de las zonas ecológicas de Pultocc Chico, Carhuancho y Huillcani, en dichas zonas se logra ubicar 2 grupos genéticos diferentes en una cuadrícula de 2995.4 Has (**Mapa 02**).

b. Distancia genética

Los valores de distancia genética se encuentran de 0.368 a 0.556, lo que significa una diversidad genética media a alta. Las colectas de Pultocc Chico, Carhuancho y Huillcani poseen los mayores valores de distancia genética (0.444 a 0.556) y las zonas de Santa Inés y Ccarhuaccpampa presentan los menores valores de distancia genética (0.368 a 0.444) en cuadrículas de 1078.5 Has. (**Mapa 03**).



3.3. Diversidad genética de la especie forrajera *Poa perligulata*

3.3.1. Diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética dentro de la población, comprende el análisis de datos de 28 colectas de *Poa perligulata*, obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores. Considera el estudio de los individuos que conforman las 5 zonas ecológicas para tener una idea aproximada de la diversidad genética en la población total de la especie.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población

Las 6 combinaciones de iniciadores amplificaron 270 marcadores AFLP y 57.1% fueron polimórficas (**Tabla 3-10**). El número de fragmentos polimórficos fue de 18 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con 46.2% de polimorfismo y 32 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA con 61.5% de polimorfismo; sin embargo el mayor porcentaje de polimorfismo fue 65.1% para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG. Las combinaciones *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC y *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG aportaron menos a la detección de polimorfismo (**Tabla 3-10**). Los marcadores monomórficos variaron de 15 a 23 loci (**Tabla 3-3**).

Tabla 3-10. Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie *Poa perligulata* con 6 combinaciones de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	(nt)	(np)	(P)	(T)	(%) de polimorf.
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTG	47	28	0.596	0.181	59.6
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTA	45	28	0.622	0.181	62.2
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CGG	44	21	0.477	0.135	47.7
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGG	43	28	0.651	0.181	65.1
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGA	52	32	0.615	0.206	61.5
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CAC	39	18	0.462	0.116	46.2
Total	270	155	3.423	1.000	-
Promedio	45	26	0.571	0.167	57.1

(nt): número total de loci. (np): número de loci polimórfico. (P): proporción de loci polimórfico. Y (T): proporción de marcadores polimórficos de cada primer al polimorfismo total.

b. Diversidad genética en la población

En la población estudiada se halló un promedio de diversidad genética (h) de 0.341, índice que podría ser relativamente medio. Asimismo, de 155 marcadores polimórficos amplificados, 143 se presentan con una frecuencia de más del 5% en la población (Tabla 3-11).

Tabla 3-11. Diversidad genética en la población de la especie *Poa perligulata* .

Descripción de loci y diversidad genética	Loci polimórficos
Nº Bandas	155
Nº Bandas Freq. (>= 5%)	143
Promedio (h)	0.341
SE del promedio (h)	0.012

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar

3.3.2. Diversidad genética interpoblacional

La diversidad genética entre las poblaciones de la especie *Poa perligulata*, se realizó el análisis comparativo de 6 colectas entre 5 zonas ecológicas, usando 6 combinaciones de iniciadores.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP

El estudio muestra que el mayor número de marcadores AFLP fue 136 para Pultocc Chico y el menor fue 99 para la zona de Quesera (Tabla 3-12).

b. Marcadores exclusivos

El análisis reveló marcadores AFLP exclusivos para cada zona ecológica, que varió de 1 para Huaracco a 5 para Pultocc Chico (Tabla 3-12 y

Figura 3-6). En las poblaciones de Pultocc Chico y Carhuanchu se encuentran el mayor número de marcadores exclusivos, significaría que sus individuos presentan patrones genéticos propios.

Tabla 3-12. Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas altoandinas, de la especie *Poa perligulata*.

Descripción de loci y diversidad genética	Zonas ecológicas de las colectas					Prom. (h)
	Santa Inés	Pultocc Chico	Huaracco	Carhuanchu	Qesera	
Nº bandas	131	136	104	128	99	120
Nº bandas Freq. (>= 5%)	131	136	104	128	99	120
Nº bandas exclusivas	2	5	1	3	2	3
Promedio (h)	0.309	0.320	0.195	0.296	0.160	0.256
SE del promedio (h)	0.014	0.014	0.015	0.015	0.014	0.014

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar.

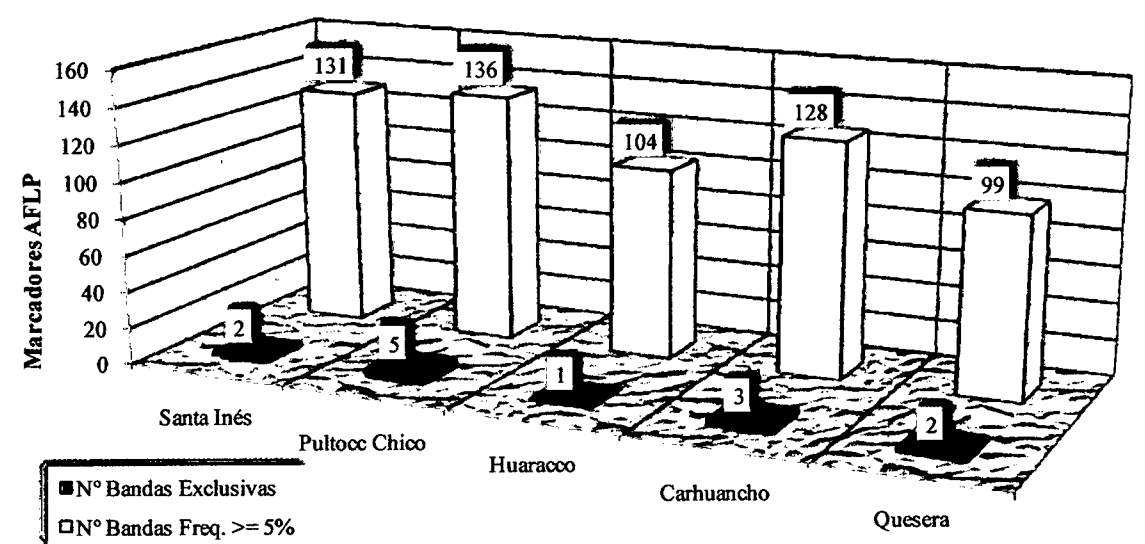


Figura 3-6. Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Poa perligulata*.

En Santa Inés se detectaron 2 marcadores exclusivos para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA con frecuencias de 0.167. Por el contrario, en Pultocc Chico el mayor número de marcadores exclusivos fue 5 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, *EcoRI*-ACA + *MseI*-

CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.2 y 0.4. En Huaracco el menor número de marcadores exclusivos fue 1 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG con una frecuencia de 0.167. En Carhuanchó fue 3 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG con una frecuencia de 0.167. Por último, en Quesera fue 2 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG con una frecuencia de 0.2 (Tabla 3-13). En resumen, los marcadores exclusivos de las poblaciones por zonas ecológicas fueron detectados con las 6 combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC. Por tanto, los 6 aportaron para diferenciar poblaciones en esta especie.

Tabla 3-13. Marcadores exclusivos y sus frecuencias de la poblaciones por zonas ecológicas de la especie *Poa perligulata*.

Nº	Combinaciones de iniciadores	Marcad.	Freq.	Nº	Combinaciones de iniciadores	Marcad.	Freq.
Santa Inés				Huaracco			
1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	18	0.167	1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	9	0.167
2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTA	3	0.167	Carhuanchó			
Pultocc Chico				1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	26	0.167
1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	3	0.2	2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTA	22	0.167
2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	23	0.2	3	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGG	17	0.167
3	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTA	14	0.2	Quesera			
4	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CGA	20	0.4	1	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	4	0.2
5	<i>EcoRI</i> -ACA+ <i>MseI</i> -CAC	5	0.2	2	<i>EcoRI</i> -AGG+ <i>MseI</i> -CTG	11	0.2

c. Diversidad genética entre las poblaciones

En las poblaciones de las zonas ecológicas, se calculó en promedio 0.256 de índice de diversidad genética. Las poblaciones de Santa Inés, Pultocc

Chico y Carhuanchu presentan los mayores valores de diversidad; y, Huaracco y Quesera son de menor valor de diversidad (Tabla 3-12 y Figura 3-7).

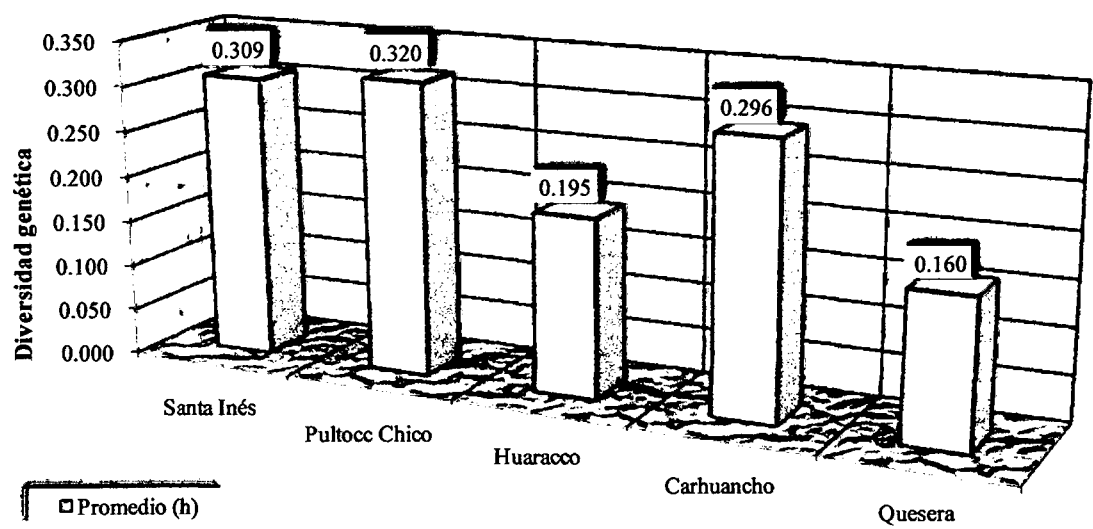


Figura 3-7. Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Poa perligulata*.

3.3.3. Análisis de distancia genética

Los datos obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores para las 28 muestras de la especie *Poa perligulata*, permitió representar gráficamente a las colectas genéticamente cercanos y observar, en forma relativa, la diferencia genética entre zonas ecológicas.

a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)

Los índices de similitud genética variaron de 0.301 a 1 con un promedio de 0.641, lo cual indica un nivel medio de diversidad genética en las muestras de la especie *Poa perligulata*. Además, los resultados muestran que la colecta PSI-1 es similar a la colecta PSI-2 en 0.939 y ésta a su vez es similar a PSI-21

en 0.796, es decir que tienen en común 94% y 80% de los marcadores moleculares (Tabla 3-14).

Tabla 3-14. Índices de similitud genética con el coeficiente Jaccard (J), de la especie *Poa perligulata* .

Colectas	Similitud	Colectas	Similitud	Colectas	Similitud
PSI-1	0.939	PHC-16	1.000	PQE-25	0.844
PSI-2	0.796	PHC-18	0.973	PQE-27	0.987
PCH-21	0.422	PHC-17	0.952	PQE-28	0.903
PSI-5	0.469	PPC-11	1.000	PQE-29	0.455
PPC-7	0.401	PHC-13	0.425	PCH-23	0.321
PHC-15	0.377	PPC-8	0.471	PSI-3	0.313
PPC-10	0.383	PCH-24	0.364	PCH-20	0.301
PCH-19	0.425	PSI-6	0.841	PHC-14	-
PQE-30	0.352	PCH-22	0.832	-	-
PSI-4	0.973	PPC-9	0.780	-	-

b. Análisis de agrupamiento UPGMA

El dendograma (Figura 3-8) muestra que no hay grupos que encierran individuos de una misma zona ecológica, por tanto es una referencia de mediana diversidad genética de la población. Se observa 6 grupos, de las cuales 3 están formados por una sola colecta (grupos unitarios). Los grupos, a excepción de los unitarios, agrupan colectas de las 5 zonas ecológicas en estudio, prevaleciendo 3 individuos de Santa Inés del grupo 1, 4 de Huaracco en el grupo 2 y 4 de Quesera en el grupo 3. Esto demostraría la existencia de marcadores comunes entre las zonas.

Las poblaciones con coeficientes de similitud máxima (1.00) fueron PHC-16 con PHC-18 y PPC-11 con PHC-13, de Huaracco y Pultocc Chico recolectadas con una diferencia en distancia de 19 Km y altitud 4500 y 4700m (Figura 3-8 y Figura 3-9); por tanto las variaciones de marcadores genéticos

no estarían relacionadas con la distancia geográfica ni altitud. Esto es confirmado por las 4 colectas de Huaracco agrupadas en el grupo 2 con coeficiente de similitud alto (0.952), similar detalle se observa para 4 colectas de Quesera agrupadas con 0.844 de similitud (**Figura 3-8**). Estos resultados implican que la población de éstas zonas hay baja diversidad genética.

Las muestras se encuentran distribuidas en promedio de 3 grupos. Las colectas de las zonas de Santa Inés y Carhuacho se encuentran distribuidas en 4 grupos, seguido por las colectas de las zonas de Pultocc Chico y Huaracco (3 grupos) (**Tabla 3-15**). En consecuencia, los individuos dentro de esas 4 zonas ecológicas difieren uno del otro, por tanto hay alta diversidad genética y existen marcadores comunes entre las zonas.

Tabla 3-15. Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie *Poa perligulata*.

Grupos	Santa Inés			Pultocc Chico			Huaracco			Carhuacho			Quesera			Nº de colectas
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
G 1	2	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	9
G 2	0	1	0	1	0	1	1	3	0	0	0	1	0	0	0	8
G 3	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	4	0	0	8
G 4	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
G 6	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Grupos unitarios	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	
Grupos por sitio	1	2	2	2	2	1	3	1	0	2	2	2	2	0	0	28
Grupos por zona	4			3			3			4			2			

(A, B y C): sitios de recolección.

La representación en el espacio bidimensional no métrico a través de puntos de similitud, obtenido a partir de la matriz de similitud, refleja las distancias entre las colectas de la población de *Poa perligulata* con un

coeficiente de stress 0.1086, lo que indica que las interacciones de las distancias entre las colectas de los grupos formados, es bueno (**Figura 3-9**); se observa, que las colectas similares se muestran más cerca y las diferentes más lejos entre sí, ratificando los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA; sin embargo, las colectas PSI-5 y PHC-15 son más distantes frente a las colectas del grupo formado, respectivamente.

c. Coeficiente de Correlación (r)

El coeficiente de correlación cofenética arrojó un valor de $r = 0.977$, el cual significa que es alto y sugiere una distorsión baja del dendograma.

d. Reproducibilidad

El análisis de reproducibilidad “bootstrap” (2000 repeticiones) estableció la conformación de 6 grupos genéticos. El grupo 1 presentó un valor de reproducibilidad bajo de 6%, a comparación de los grupos 2 y 3 que fue 23% y 67% de confiabilidad (más consistentes) (**Figura 3-8**). En los grupos se observa valores de reproducibilidad 100%, que encierran las 4 colectas de Huaracco con una de Santa Inés y otra de Pultocc Chico (grupo 2); similar detalle muestra el grupo 3 que agrupa 4 individuos de Quesera junto a una de Santa Inés, Carhuancho y Pultocc Chico. Lo anterior demuestra que esas colectas estarán unidas siempre, por presentar marcadores genéticos similares entre ellas.

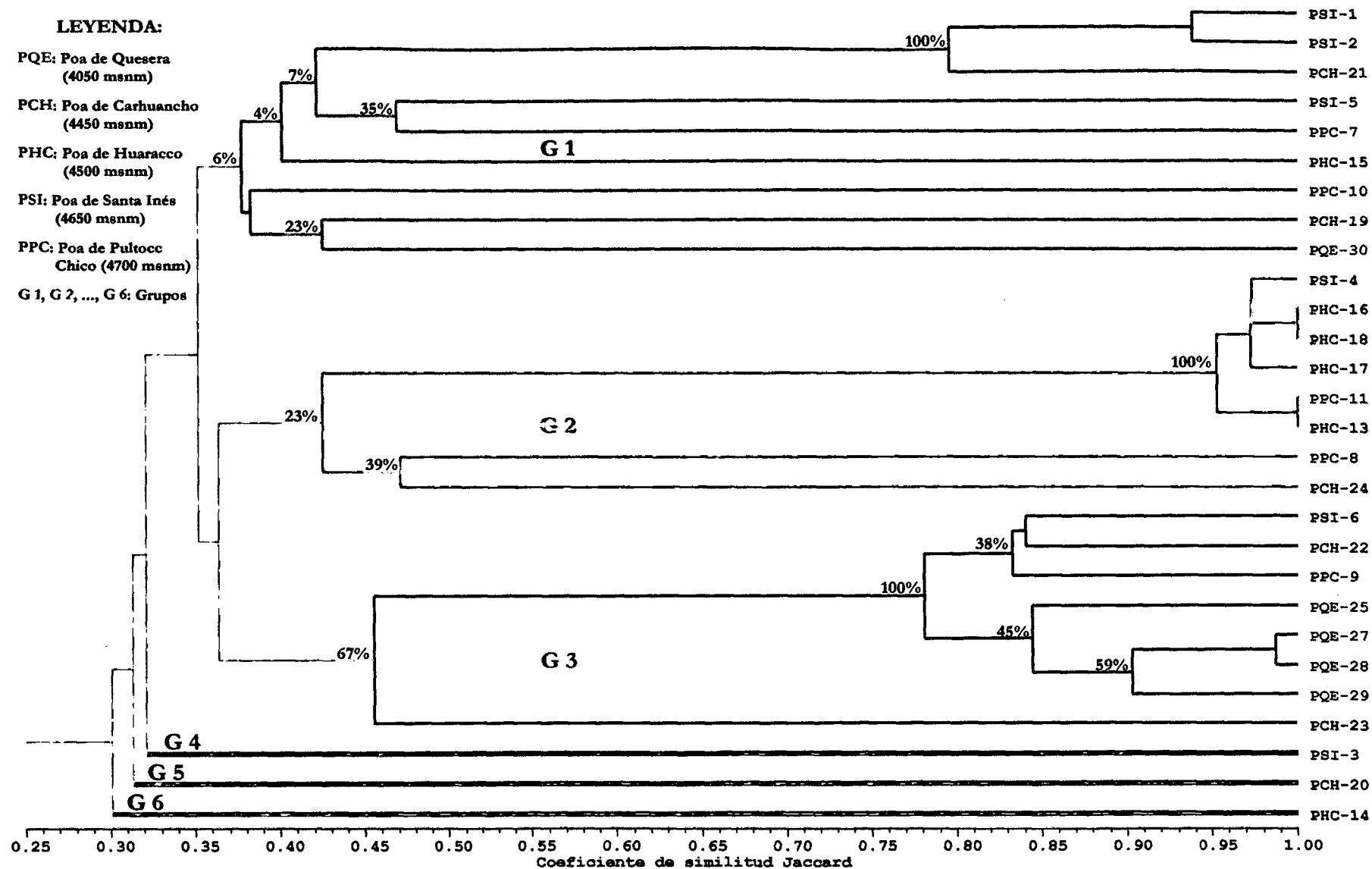


Figura 3-8. Dendrograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y los valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa altoandina *Poa perligulata*.

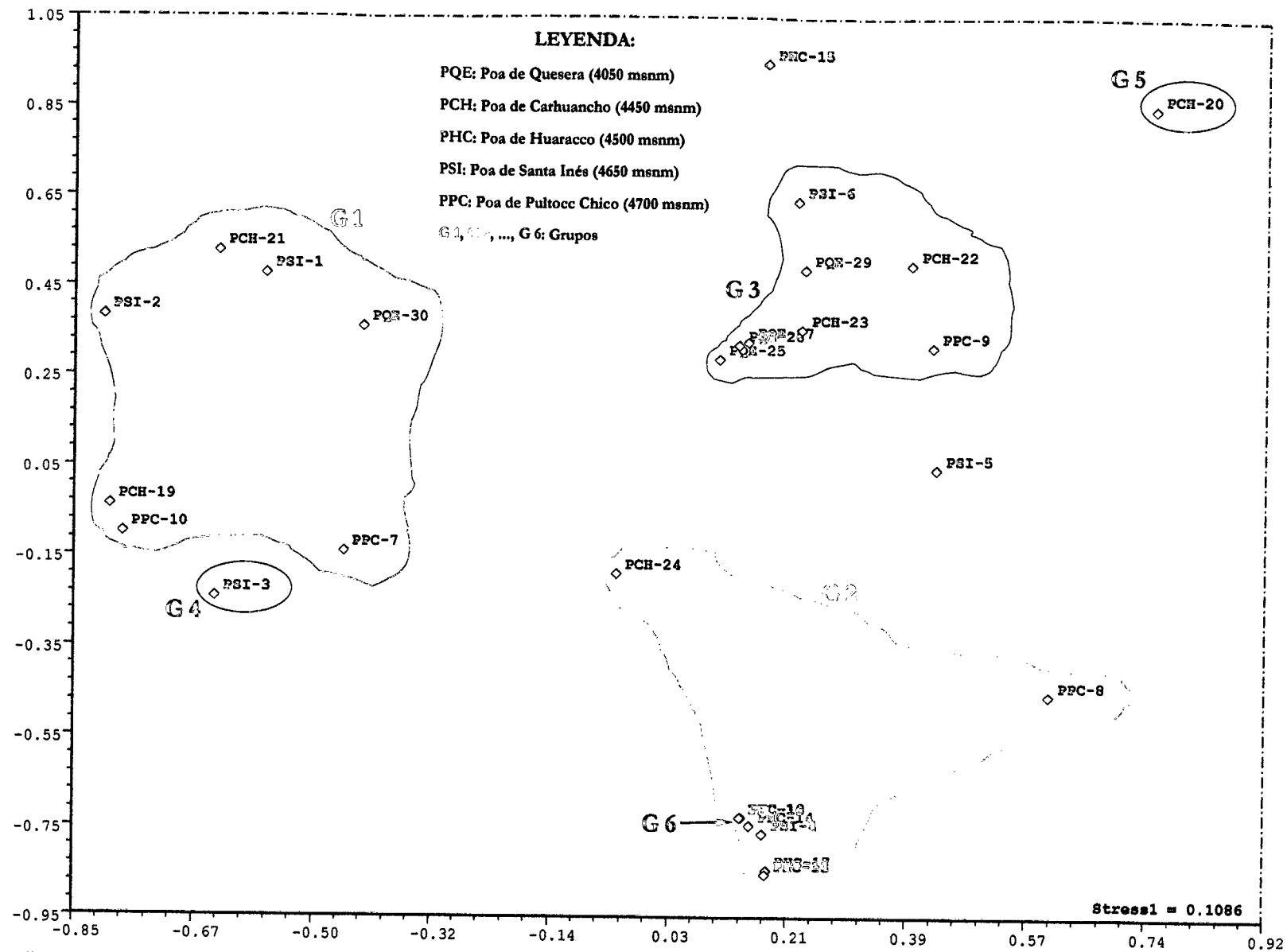


Figura 3-9. Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa altoandina *Poa perigulata*.

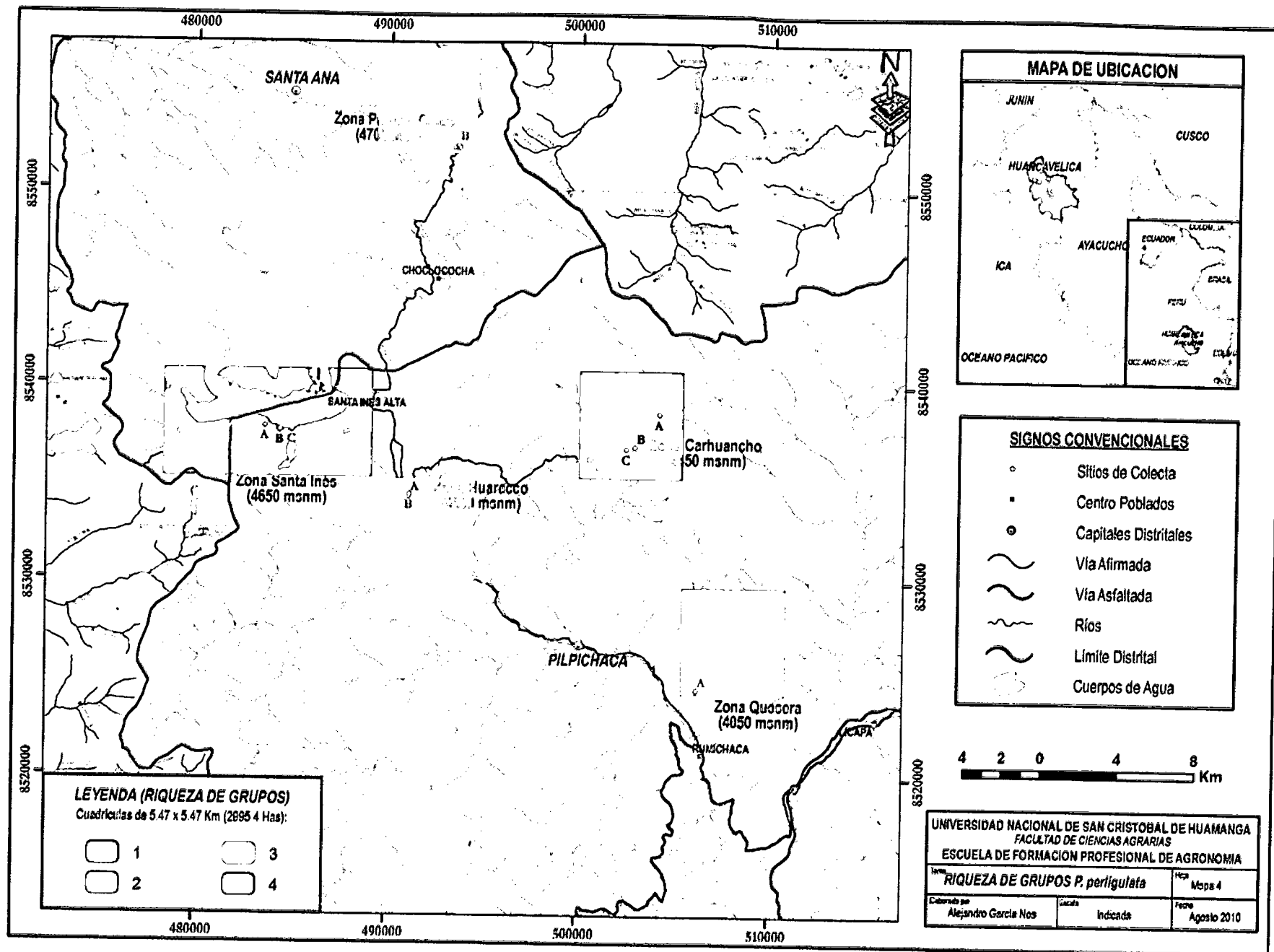
3.3.4. Distribución geográfica

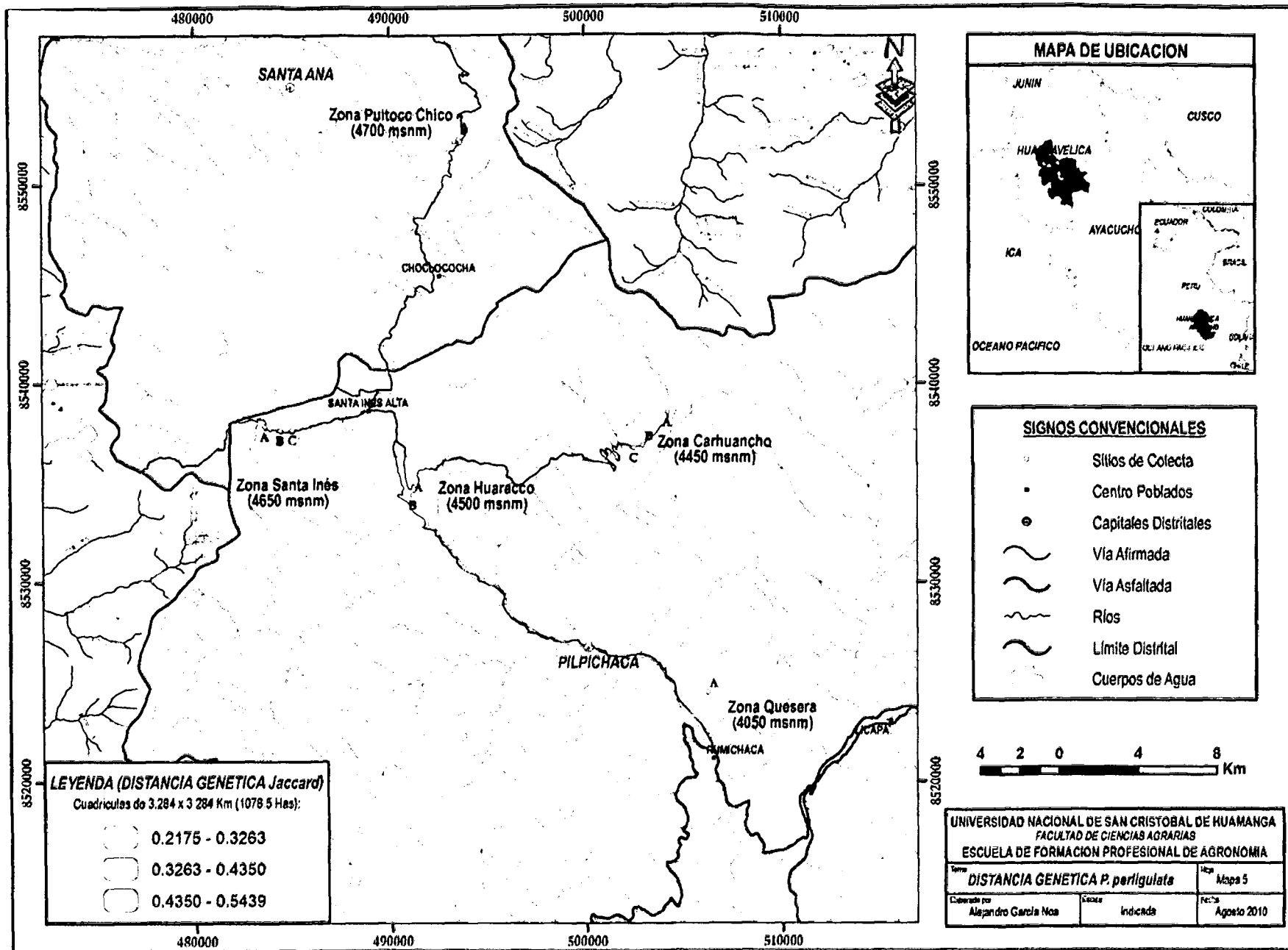
a. Riqueza de grupos

La distribución espacial en la zonas de estudio, mediante el programa DIVA-GIS 5.2 con apoyo del ArcGIS 9.3, reafirma que la mayor riqueza de grupos le corresponden a colectas de las zonas ecológicas de Santa Inés y Carhuanchu, en dichas zonas se logra ubicar 4 grupos genéticos diferentes de los 6 formados, en cuadrículas de 2995.4 Has; seguido por Pultocc Chico y Huaracco (**Mapa 04**).

b. Distancia genética

Los valores de distancia genética se encuentran de 0.218 a 0.544, lo que significa una diversidad genética media a alta. Las colectas de las zonas de Santa Inés, Pultocc Chico y Carhuanchu poseen los mayores valores de distancia genética (0.435 a 0.544) y la zona de Quesera sería la que presenta bajos valores de distancia genética (0.213 a 0.326) en cuadrículas de 1078.5 Has. (**Mapa 05**).





3.4. Diversidad genética de la especie *Muhlenbergia ligularis*

3.4.1. Diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética dentro de la población, comprende el análisis de datos de 29 colectas de *Muhlenbergia ligularis*, obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores. Considera el estudio de los individuos que conforman las 5 zonas ecológicas para tener una idea aproximada de la diversidad genética en la población total de la especie.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población

Las 6 combinaciones de iniciadores amplificaron 262 marcadores AFLP y 47.3% fueron polimórficas (**Tabla 3-16**). El número de marcadores polimórficos fue 15 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA (32.6% de polimorfismo) y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA (39.5% de polimorfismo), y 29 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG con 55.8% de polimorfismo; sin embargo el mayor porcentaje de polimorfismo fue 62.2% para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG. Las combinaciones *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG y *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG aportaron más a la detección de polimorfismo (**Tabla 3-16**). Los fragmentos monomórficos variaron de 17 a 31 (**Tabla 3-3**).

b. Diversidad genética en la población

En la población estudiada se halló un promedio de diversidad genética (h) de 0.241, índice que podría ser relativamente bajo. Además, de 125 marcadores polimórficos amplificados, 110 tienen una frecuencia de más del 5% en la población (**Tabla 3-17**).

Tabla 3-16. Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie *Muhlenbergia ligularis* con 6 combinaciones de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	(<i>nt</i>)	(<i>np</i>)	(<i>P</i>)	(<i>T</i>)	(%) de polimorf.
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTG	52	29	0.558	0.232	55.8
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CTA	46	15	0.326	0.120	32.6
<i>Eco</i> RI-AGG + <i>Mse</i> I-CGG	45	28	0.622	0.224	62.2
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGG	41	17	0.415	0.136	41.5
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CGA	38	15	0.395	0.120	39.5
<i>Eco</i> RI-ACA + <i>Mse</i> I-CAC	40	21	0.525	0.168	52.5
Total	262	125	2.840	1.000	-
Promedio	44	21	0.473	0.167	47.3

(*nt*): número total de loci. (*np*): número de loci polimórfico. (*P*): proporción de loci polimórfico. Y (*T*): proporción de marcadores polimórficos de cada primer al polimorfismo total.

Tabla 3-17. Diversidad genética en la población de la especie *Muhlenbergia ligularis*.

Descripción de loci y diversidad genética	Loci polimórficos
Nº Bandas	125
Nº Bandas Freq. (>= 5%)	110
Promedio (<i>h</i>)	0.241
SE del promedio (<i>h</i>)	0.012

(*h*): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar

3.4.2. Diversidad genética interpoblacional

La diversidad genética entre las poblaciones de la especie *Muhlenbergia ligularis*, comprende el análisis comparativo de 6 colectas entre 5 zonas ecológicas, utilizando 6 combinaciones de iniciadores.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP

El análisis revela que el mayor número de marcadores AFLP fue 94 para Carhuanchu y el menor fue 67 para Huilcani (Tabla 3-18).

b. Marcadores exclusivos

La evaluación reveló marcadores AFLP exclusivos para cada zona ecológica, que varió de 0 para Huilcani a 13 para Carhuanchu (Tabla 3-18 y Figura 3-10). Entonces, la información genética en cada zona es diferente una de la otra, siendo la poblaciones de Ccarhuaccpampa y Carhuanchu más diferenciada, y por el contrario la población de Huilcani no tiene marcadores exclusivos, esto significa que sus individuos no presentan patrones genéticos propios.

Tabla 3-18. Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas altoandinas, de la especie *Muhlenbergia ligularis*.

Descripción de loci y diversidad genética	Zonas ecológicas de las colectas					Prom. (h)
	Santa Inés	Pultocc Chico	Carhuanchu	Huilcani	Ccarhuaccpampa	
Nº bandas	74	78	94	67	81	79
Nº bandas Freq. (>= 5%)	74	78	94	67	81	79
Nº bandas exclusivas	1	4	13	0	11	6
Promedio (h)	0.147	0.157	0.194	0.129	0.207	0.167
SE del promedio (h)	0.017	0.016	0.016	0.017	0.019	0.017

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar.

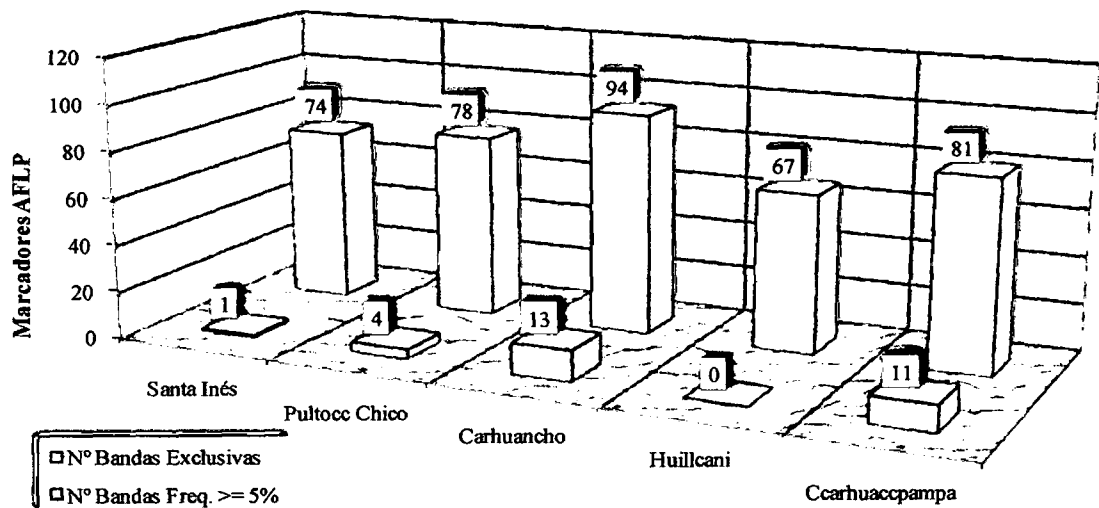


Figura 3-10. Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Muhlenbergia ligularis*.

En Santa Inés el número de marcadores exclusivos fue 1 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG con una frecuencia de 0.333. En Pultocc Chico fue 4 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA con frecuencia de 0.167. En Carhuanchó el mayor número de marcadores exclusivos fue 13 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con frecuencias de 0.167 a 0.333. En Huillcani no se detectó marcadores exclusivos. Por último, en Ccarhuaccpampa fue 11 para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA con frecuencias de 0.167 a 0.500 (**Tabla 3-19**). En resumen, estos marcadores de las poblaciones por zonas fueron detectados con las 6 combinaciones de iniciadores *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTA, *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG, *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC. Por tanto, los 6 aportaron para diferenciar poblaciones en esta especie.

c. Diversidad genética entre las poblaciones

En las poblaciones de las zonas ecológicas se obtuvo en promedio 0.167 de índice de diversidad genética. Las poblaciones de Carhuanchó y Ccarhuaccpampa presentan los mayores valores de diversidad; y, Santa Inés y Huillcani son de menor índice de diversidad (**Tabla 3-18 y Figura 3-11**).

los cuales son una referencia de mediana diversidad genética. Además, muestra 9 grupos, siendo 3 integradas por una sola colecta (grupos unitarios). Los grupos 1 y 6 agrupan colectas de 3 zonas ecológicas en estudio, prevaleciendo 3 individuos de Santa Inés en el primero; y, 3 de Huillcani y Ccarhuaccpampa en el segundo. Esto demostraría la existencia de marcadores comunes entre las zonas.

Las poblaciones distintas son de Ccarhuaccpampa y Santa Inés con una diferencia en distancia geográfica de 34 Km y altitud de 4100 y 4650 m. Además, 4 colectas de Pultocc Chico se encuentra concentrada en el grupo 2, separadas del resto desde 18 a 40 Km y a una altitud de 4700 m. La cercanía de 3 individuos de Huillcani y Ccarhuaccpampa en el grupo 6, revelaría la poca distancia geográfica 7 Km y similar altitud (4000 y 4100 m) (**Figura 3-12**). Lo anterior muestra que las colectas conservan marcadores genéticos propios y otras la comparten para diferenciarse del resto; estas variaciones estarían relacionadas a la distancia geográfica y altitud entre las zonas.

La población de Carhuanchu se encuentra distribuida en 5 grupos, es decir que las colectas de esta zona presentan mayor diversidad genética, seguido por Ccarhuaccpampa (3 grupos). Santa Inés, Pultocc Chico y Huillcani distribuidos en 2 grupos, serían de menor diversidad (**Tabla 3-21**). Los individuos dentro de esas 3 zonas existen marcadores comunes entre ellas a excepción de Carhuanchu, que presentaría individuos diferentes uno del otro, pero comunes a muestras de otras zonas.

La representación en el espacio bidimensional no métrico a través de puntos de similitud, obtenido a partir de la matriz de similitud, refleja las distancias entre las colectas de la población de *Muhlenbergia ligulares* con un

coeficiente de stress 0.0806, lo que indica que las interacciones de las distancias entre las colectas de los grupos formados, es bueno (**Figura 3-13**); se observa, que las colectas similares se muestran más cerca y las diferentes más lejos entre sí, ratificando los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA; sin embargo, la colecta MPC-9 está más distante de la colecta MPC-7 del grupo 3, y más cerca a las colectas de los grupos 1 y 2.

Tabla 3-21. Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie *Muhlenbergia ligularis*.

Grupos	Santa Inés			Pultocc Chico			Carhuancho			Huillcani			Ccarhuaccp.			Nº de colectas
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
G 1	2	0	2	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	7
G 2	0	0	0	1	1	2	0	1	1	0	0	0	0	0	0	6
G 3	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
G 4	0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2
G 5	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	3	0	7
G 7	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	2
G 9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Grupos unitarios	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0	0	1	0	0	
Grupos por sitio	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	0	29
Grupos por zona	2			2			5			2			3			

(A, B y C): sitios de recolección.

c. Coeficiente de Correlación (r)

El coeficiente de correlación cofenética ($r = 0.826$) obtenido entre la matriz de similitud y la matriz cofenética de agrupamiento nos demuestra que el dendograma representa adecuadamente a las relaciones de similitud genética existentes entre las colectas.

d. Reproducibilidad

El análisis de reproducibilidad “bootstrap” (2000 repeticiones) estableció la conformación de 9 grupos genéticos. Los grupos 1, 2, 3 y 6 presentaron valores de reproducibilidad entre 1% y 9% (menos consistentes); el grupo 4 presentó 41% de confianza y del grupo 8 fue 100% de consistencia unido con una similitud de 0.774 (**Figura 3-12**), es decir los individuos del grupo estarán unidos siempre, por presentar marcadores moleculares similares entre ellos.

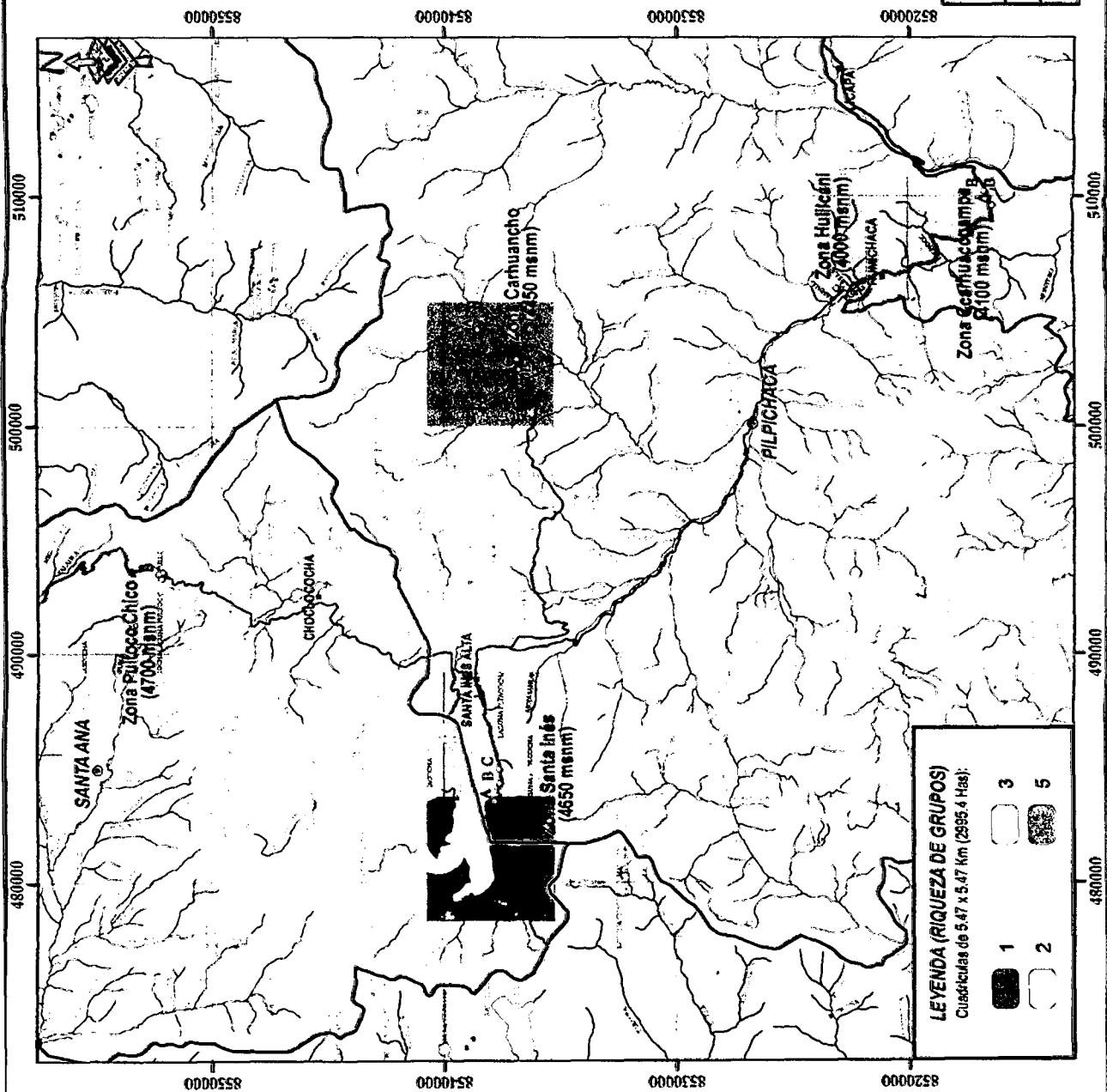
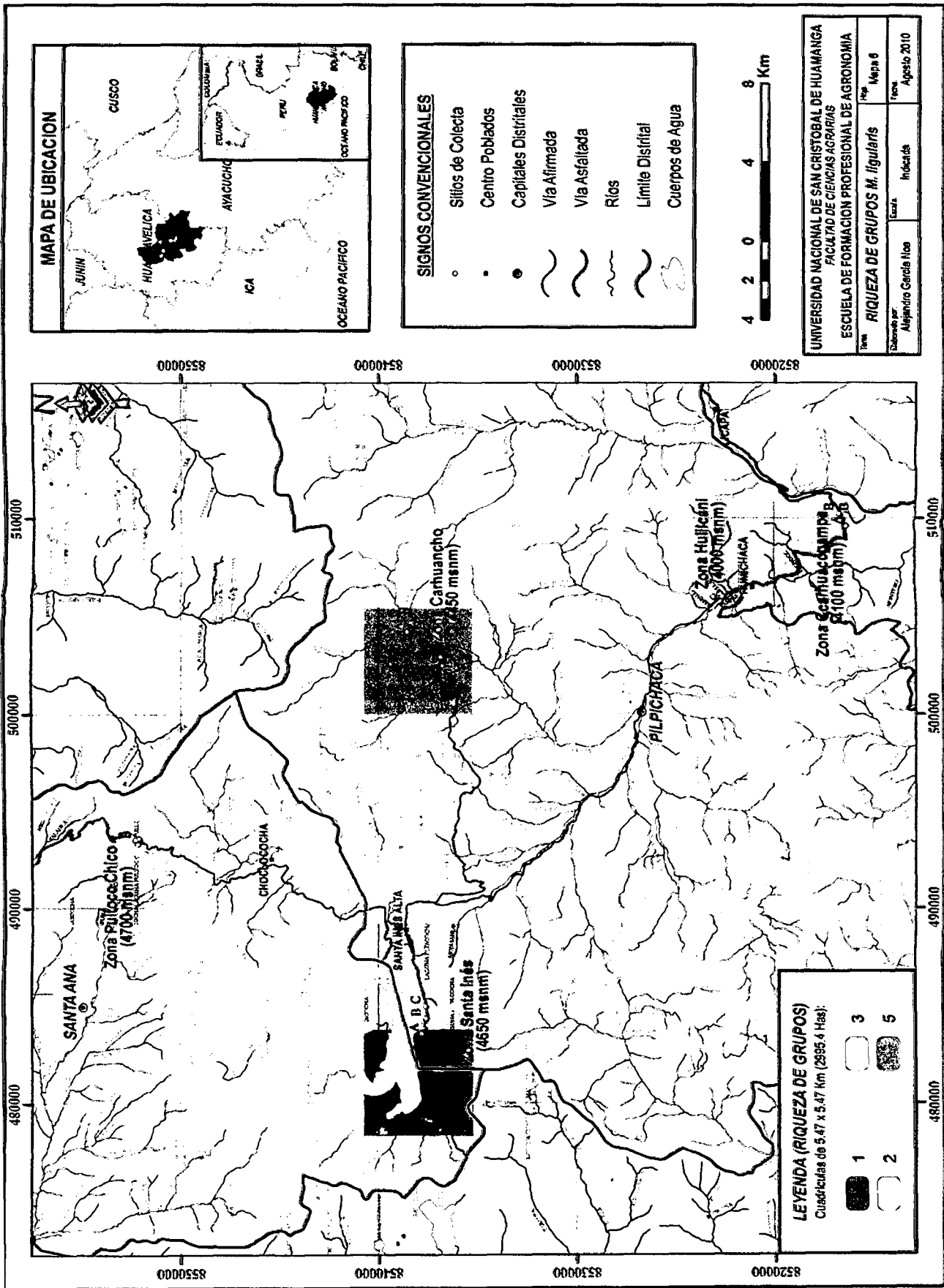
3.3.5. Distribución geográfica

a. Riqueza de grupos

En el análisis espacial, mediante el programa DIVA-GIS 5.2 con apoyo del GIS ArcView 3.3, se observa que el mayor número de grupos le corresponden a la zonas ecológicas de Carhuanchu, seguido por Ccarhuaccpampa, en dichas zonas se logra ubicar 5 y 3 grupos genéticos diferentes en una cuadrícula de 2995.4 Has (**Mapa 06**).

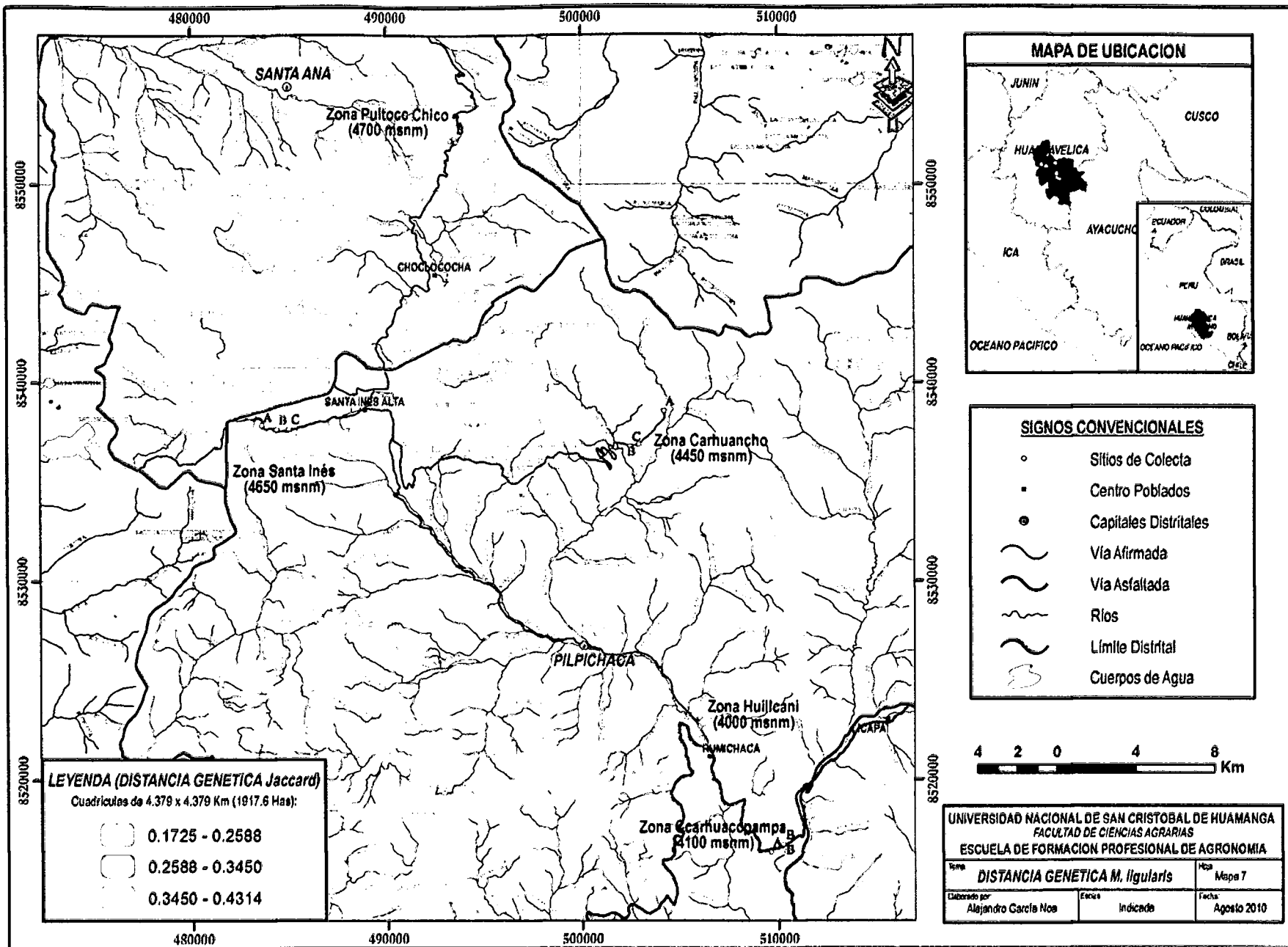
b. Distancia genética

Los valores de distancia genética se encuentran de 0.173 a 0.431, lo que significa una diversidad genética mediana a media a alta. Los mayores valores de distancia genética (0.345 a 0.431) corresponden a las zonas de Carhuanchu y Ccarhuaccpampa. Las colectas de Huilcani presentan los menores valores de distancia genética (0.173 a 0.259) en cuadrículas de 1917.6 Has (**Mapa 07**).



LEYENDA (RIQUEZA DE GRUPOS)
Cuadrículas de 5.47 x 5.47 Km (2995.4 Has):

1	2	3	4	5
---	---	---	---	---



3.5. Diversidad genética de la especie *Trifolium amabile*

3.5.1. Diversidad genética intrapoblacional

La diversidad genética dentro de la población, comprende el análisis de datos de las 30 colectas de *Trifolium amabile*, obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores. Considera el estudio de los individuos que conforman las 5 zonas ecológicas para tener una idea aproximada de la diversidad genética en la población total de la especie.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP en la población

Las 6 combinaciones de iniciadores amplificaron 237 marcadores AFLP y 39.3% fueron polimórficas (Tabla 3-22). El número de fragmentos polimórficos fue 12 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CAC con 34.3% de polimorfismo y 20 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG con 52.6 % de polimorfismo. Las combinaciones *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG aportaron más a la detección de polimorfismo (Tabla 3-22). Los fragmentos monomórficos variaron de 18 a 30 (Tabla 3-3).

Tabla 3-22. Marcadores AFLP y polimorfismo para la especie *Trifolium amabile* con 6 combinaciones de iniciadores.

Combinaciones de iniciadores	(nt)	(np)	(P)	(T)	(%) de polimorf.
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTG	47	19	0.404	0.204	40.4
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CTA	35	14	0.400	0.151	40.0
<i>EcoRI</i> -AGG + <i>MseI</i> -CGG	44	14	0.318	0.151	31.8
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGG	38	20	0.526	0.215	52.6
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CGA	38	14	0.368	0.151	36.8
<i>EcoRI</i> -ACA + <i>MseI</i> -CAC	35	12	0.343	0.129	34.3
Total	237	93	2.360	1.000	-
Promedio	40	16	0.393	0.167	39.3

(nt): número total de loci. (np): número de loci polimórfico. (P): proporción de loci polimórfico. Y (T): proporción de marcadores polimórficos de cada primer al polimorfismo total.

b. Diversidad genética en la población

En la población estudiada se halló un promedio de diversidad genética (h) de 0.330, índice que podría ser relativamente medio. Por otra parte, de 93 marcadores polimórficos amplificados, 88 se presentan con una frecuencia de más del 5% en la población (Tabla 3-23).

Tabla 3-23. Diversidad genética en la población de la especie *Trifolium amabile* .

Descripción de loci y diversidad genética	Loci polimórficos
Nº Bandas	93
Nº Bandas Freq. (>= 5%)	88
Promedio (h)	0.330
SE del promedio (h)	0.013

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar

3.5.2. Diversidad genética interpoblacional

La diversidad genética entre las poblaciones de la especie *Trifolium amabile*, abarca el análisis comparativo de 6 colectas entre 5 zonas ecológicas, usando 6 combinaciones de iniciadores.

a. Riqueza de marcadores moleculares AFLP entre poblaciones

El análisis mostró que el mayor número de marcadores AFLP fue 82 para Quesera y el menor fue 64 para Carhuanchu (Tabla 3-24).

b. Marcadores exclusivos

El análisis reportó pocos marcadores AFLP exclusivos para cada zona ecológica, que varió de 1 para Carhuanchu, Ccarhuaccpampa y Quesera a 2

para Huilcani y Hospicio (Tabla 3-24 y Figura 3-10). El número de marcadores encontrados hacen de las 5 zonas indiferentes; por tanto el contenido genético en cada zona es semejante una de la otra, es decir que las colectas presentan marcadores genéticos comunes.

Tabla 3-24. Diversidad genética y número de bandas AFLP por zonas ecológicas altoandinas, de la especie *Trifolium ambile*.

Descripción de loci y diversidad genética	Zonas ecológicas de las colectas					Prom (h)
	Carhuanchu	Huilcani	Ccarhuaccpampa	Quesera	Hospicio	
Nº bandas	64	68	79	82	78	74
Nº bandas Freq. (>= 5%)	64	68	79	82	78	74
Nº bandas exclusivas	1	2	1	1	2	1
Promedio (h)	0.168	0.200	0.336	0.250	0.295	0.250
SE del promedio (h)	0.020	0.020	0.017	0.021	0.020	0.020

(h): diversidad genética promedio. (SE): desviación estándar.

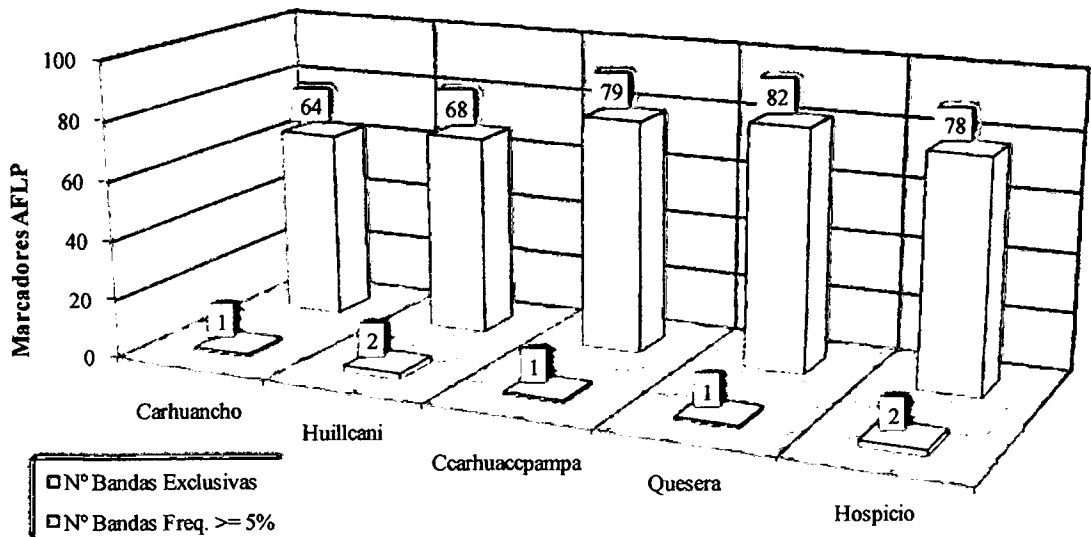


Figura 3-14. Marcadores AFLP por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Trifolium amabile*.

En Carhuanchu se detectó 1 marcador exclusivo para *EcoRI*-AGG + *MseI*-CGG con frecuencia de 0.167. En Huilcani fue 2 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGG con frecuencias de 0.167 y 0.333. En Ccarhuaccpampa fue 1 para *EcoRI*-

ACA + MseI-CAC con una frecuencia de 0.167. En Quesera fue 1 para EcoRI-ACA + MseI-CGA con una frecuencia de 0.667. Por último, en Hospicio fue 2 para EcoRI-AGG + MseI-CTA y EcoRI-ACA + MseI-CAC con una frecuencia de 0.167 (Tabla 3-25). En resumen, los marcadores exclusivos para las poblaciones por zonas ecológicas fueron detectados con 4 combinaciones de iniciadores EcoRI-AGG + MseI-CTA, EcoRI-AGG + MseI-CGG, EcoRI-ACA + MseI-CGG y EcoRI-ACA + MseI-CAC. Por tanto, éstos aportaron mínimamente para diferenciar poblaciones de esta especie.

Tabla 3-25. Marcadores exclusivos y sus frecuencia por zonas ecológicas, de la especie *Trifolium amabile* .

Nº	Combinaciones de iniciadores	Marcad.	Freq.
Carhuanchu			
1	EcoRI-AGG+MseI-CGG	1	0.167
Huillcani			
1	EcoRI-ACA+MseI-CGG	1	0.333
2	EcoRI-ACA+MseI-CGG	2	0.167
Ccarhuaccpampa			
1	EcoRI-ACA+MseI-CAC	1	0.167
Quesera			
1	EcoRI-ACA+MseI-CGA	6	0.667
Hospicio			
1	EcoRI-AGG+MseI-CTA	1	0.167
2	EcoRI-ACA+MseI-CAC	7	0.167

c. Diversidad genética entre las poblaciones

Las poblaciones de las zonas ecológicas, presentó en promedio 0.250 de índice de diversidad genética. Las población de Ccarhuaccpampa presenta el mayor índice de diversidad, seguido por Hospicio; y, Carhuanchu y Huillcani fueron de menor diversidad (Tabla 3-24 y Figura 3-13).

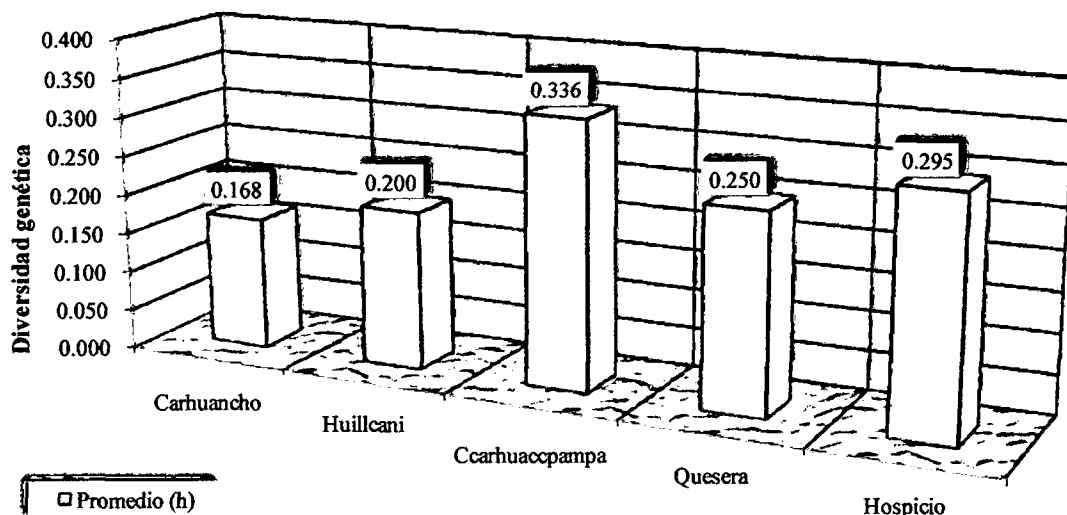


Figura 3-15. Promedios de diversidad genética por zonas ecológicas altoandinas de la especie forrajera nativa *Trifolium amabile*.

3.5.3. Análisis de distancia genética

Los datos obtenidos con las 6 combinaciones de iniciadores para las 30 muestras de la especie *Trifolium amabile*, permitió representar gráficamente a las colectas genéticamente cercanos y observar, relativamente, la diferencia genética entre zonas ecológicas.

a. Similitud genética con coeficiente de asociación Jaccard (J)

Los índices de similitud genética variaron de 0.254 a 0.790 con un promedio de 0.590, lo cual indica un nivel medio de diversidad genética. Estos índices se obtuvieron al comparar de par en par las colectas más similares entre sí, es así, que la colecta TCH-1 es similar a la colecta TCH-3 en 0.740 y ésta a su vez es similar a TCH-5 en 0.701, es decir que tienen en común 74% y 70% de marcadores (Tabla 3-26).

Tabla 3-26. Índices de similitud genética con el coeficiente Jaccard (J), de la especie *Trifolium amabile*.

Colectas	Similitud	Colectas	Similitud	Colectas	Similitud
TCH-1	0.740	THL-9	0.589	TCC-17	0.564
TCH-3	0.701	TCH-2	0.630	TCC-18	0.733
TCH-5	0.671	TCH-4	0.754	TQE-19	0.718
THL-11	0.624	TCH-6	0.675	TQE-23	0.533
THL-7	0.691	TCC-14	0.503	THO-25	0.512
THL-8	0.641	THL-10	0.625	THO-27	0.398
TQE-20	0.744	THL-12	0.526	THO-28	0.354
TQE-21	0.790	THO-29	0.628	TQE-24	0.285
TQE-22	0.700	THO-30	0.441	TCC-16	0.254
THO-26	0.636	TCC-13	0.458	TCC-15	-

b. Análisis de agrupamiento UPGMA

El dendograma (**Figura 3-16**) muestra que no hay grupos que encierran colectas de una misma zona, los cuales es una referencia de mediana diversidad genética. Se observa 8 grupos, siendo 5 formadas por una sola colecta (grupos unitarios). El grupo 1 agrupa individuos de las 5 zonas en estudio, prevaleciendo todas de Carhuanchu, 4 colectas de Huilcani y 3 de Quesera; similar detalle se observa en el grupo 4 que conglomerar individuos de 3 zonas (**Figura 3-16**). Lo anterior evidencia que las colectas de las zonas ecológicas conservan ciertos marcadores genéticos comunes; pero algunos individuos de ciertas zonas, mantienen características genéticas propias.

Las poblaciones de Ccarhuaccampa y Carhuanchu con una diferencia en distancia geográfica de 23 Km y altitud de 4000 y 4450 m, aparentemente lejanos, son indiferentes. La cercanía de la población de Huilcani, Hospicio, Quesera y Ccarhuaccampa en los grupos 1, 2 y 4, revelaría la poca distancia geográfica (2 a 8 Km) y similar altitudes (3900 y 4100 m) (**Figura 3-16**). Lo

anterior muestra que las colectas comparten marcadores genéticos; y las variaciones estarían relacionadas a la distancia geográfica y altitud entre las zonas.

La población de Ccarhuaccpampa se encuentra distribuida en 5 grupos, es decir que las colectas de esta zona presentan mayor diversidad genética, seguido por Hospicio (4 grupos). Carhuanchu y Huilcani distribuidas en 1 y 2 grupos, serían de menor diversidad (Tabla 3-27). En forma general, la población presenta marcadores comunes entre zonas ecológicas.

Tabla 3-27. Grupos formados por zonas ecológicas y sitios de recolección de la especie *Trifolium amabile*.

Grupos	Carhuanchu			Huilcani			Ccarhuaccp.			Quesera			Hospicio			N° de colectas
	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	A	B	C	
G 1	0	3	3	2	1	1	1	0	0	1	2	0	1	0	0	15
G 2	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	4
G 3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
G 4	0	0	0	0	0	0	0	2	0	1	0	1	1	1	0	6
G 5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
G 6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
G 7	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
G 8	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
Grupos unitarios	0	0	0	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	1	0	
Grupos por sitio	0	1	1	1	2	2	3	2	0	2	1	2	2	2	1	30
Grupos por zona	1			2			5			3			4			

(A, B y C): sitios de recolección.

La representación en el espacio bidimensional no métrico a través de puntos de similitud, obtenido a partir de la matriz de similitud, muestra las distancias entre las colectas de la población de *Trifolium amabile* con un coeficiente de stress 0.1964, lo que indica que las interacciones de las distancias entre las colectas de los grupos formados, es bueno (Figura 3-17);

se observa, que las colectas similares se muestran más cerca y las diferentes más lejos entre sí, ratificando los grupos formados en el análisis de agrupamiento UPGMA; sin embargo, la colecta TQE-24 (grupo 6, unitario) es más cercana a las colectas del grupo 4 y la colecta THO-28 (grupo 5, unitario) es más lejana a las colectas del grupo 4.

c. Coeficiente de Correlación (r)

El coeficiente de correlación cofenética ($r = 0.876$) calculado entre matriz de similitud y la matriz cofenética de agrupamiento nos demuestra que el dendograma representa adecuadamente a las relaciones de similitud genética existentes entre las colectas.

d. Reproducibilidad

El análisis de reproducibilidad “bootstrap” (2000 repeticiones) estableció la conformación de 8 grupos genéticos. Los grupos 1, 2 y 4 presentaron valores de reproducibilidad de 31%, 19% y 23% (buena consistencia).

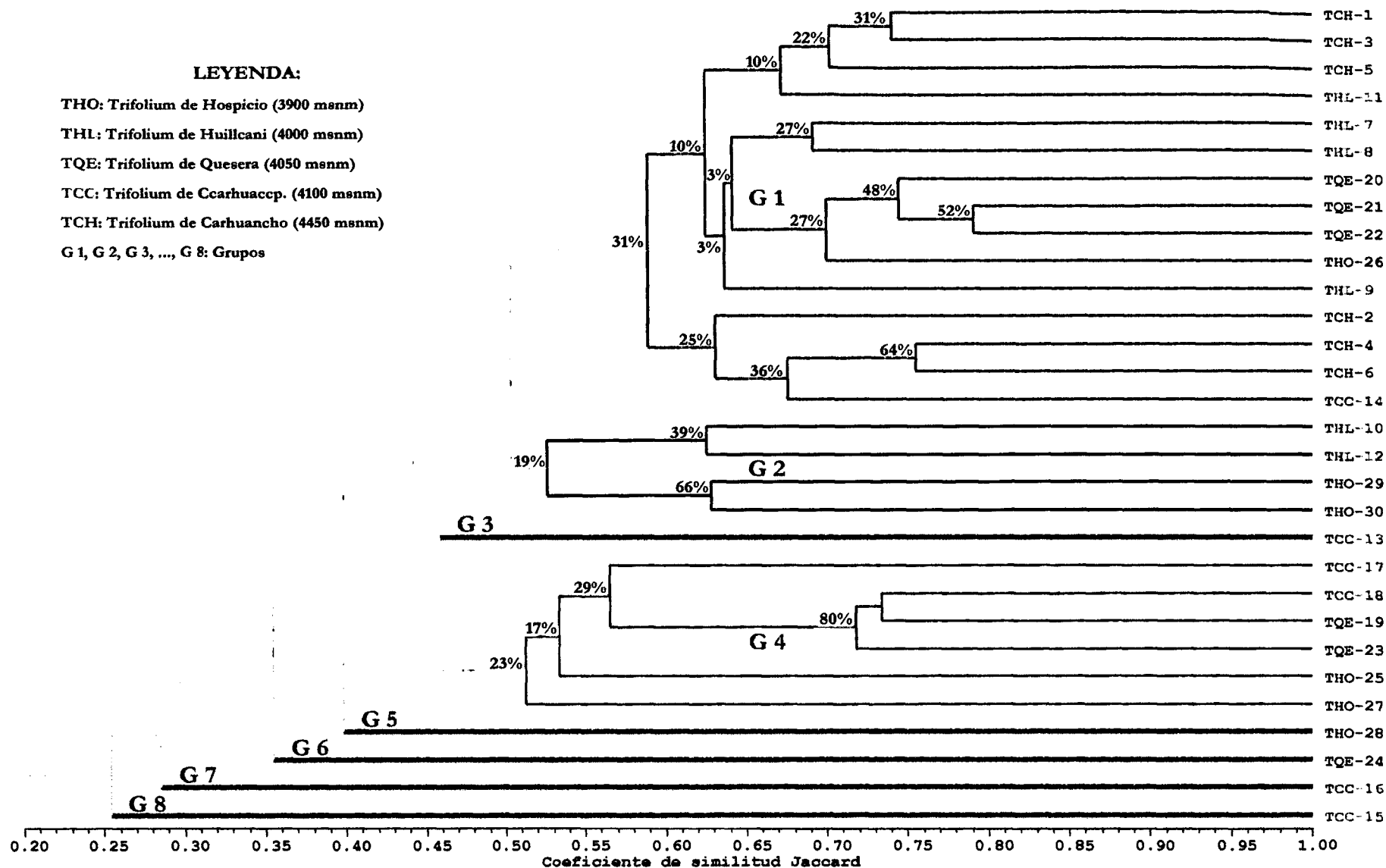


Figura 3-16. Dendrograma del análisis de agrupamiento por medias aritméticas no ponderadas (UPGMA), a partir de una matriz de similitud Jaccard (J) y los valores del porcentaje bootstrap (2000 Rep.), indicando el grado de confiabilidad de los grupos de la población de colectas de la especie forrajera nativa alto andina *Trifolium amabile*.

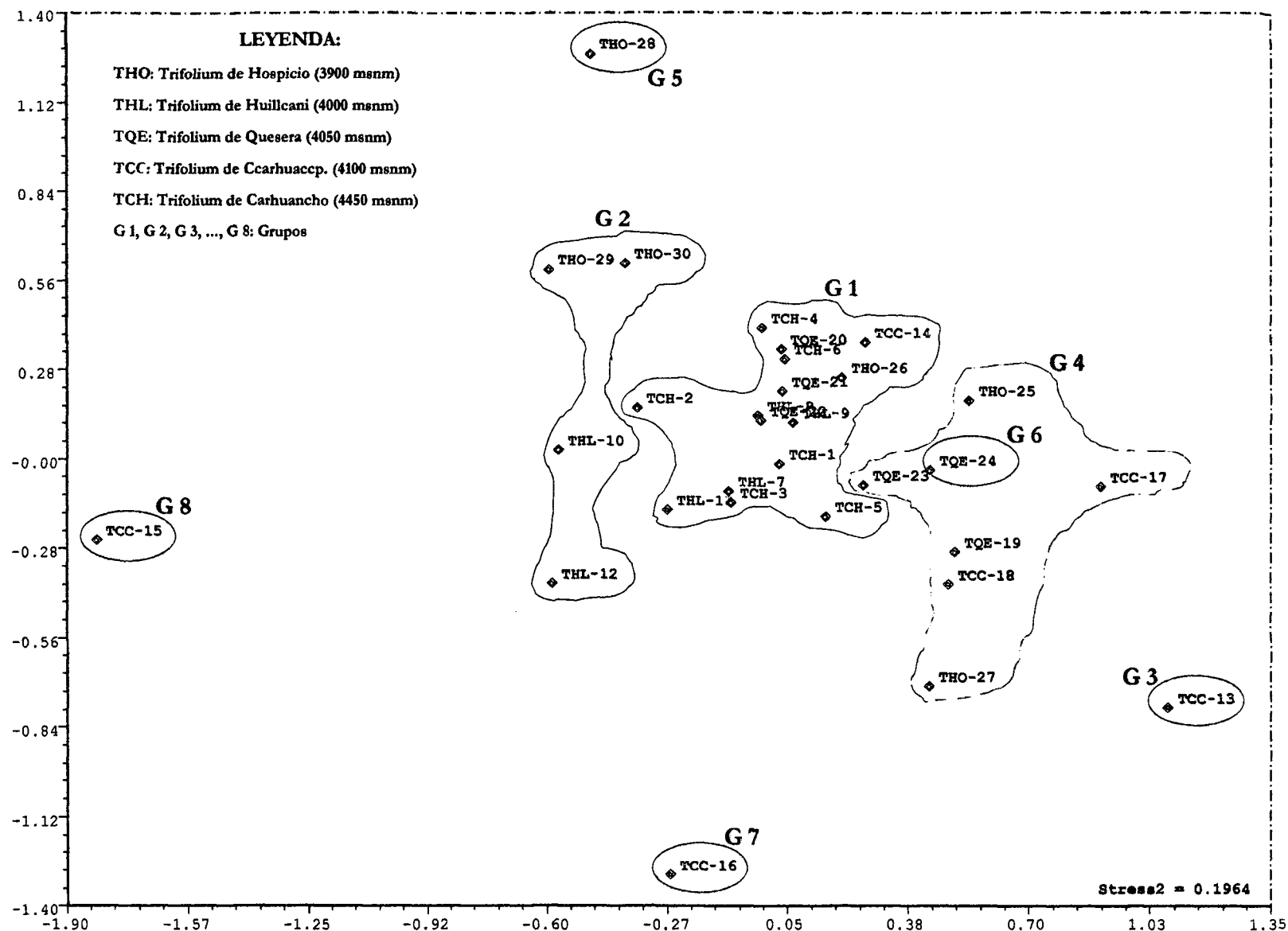


Figura 3-17. Plot del análisis bidimensional a partir de una matriz de similitud Jaccard, indicando los grupos formados en las colectas de la especie forrajera nativa alto andina *Trifolium amabile*.

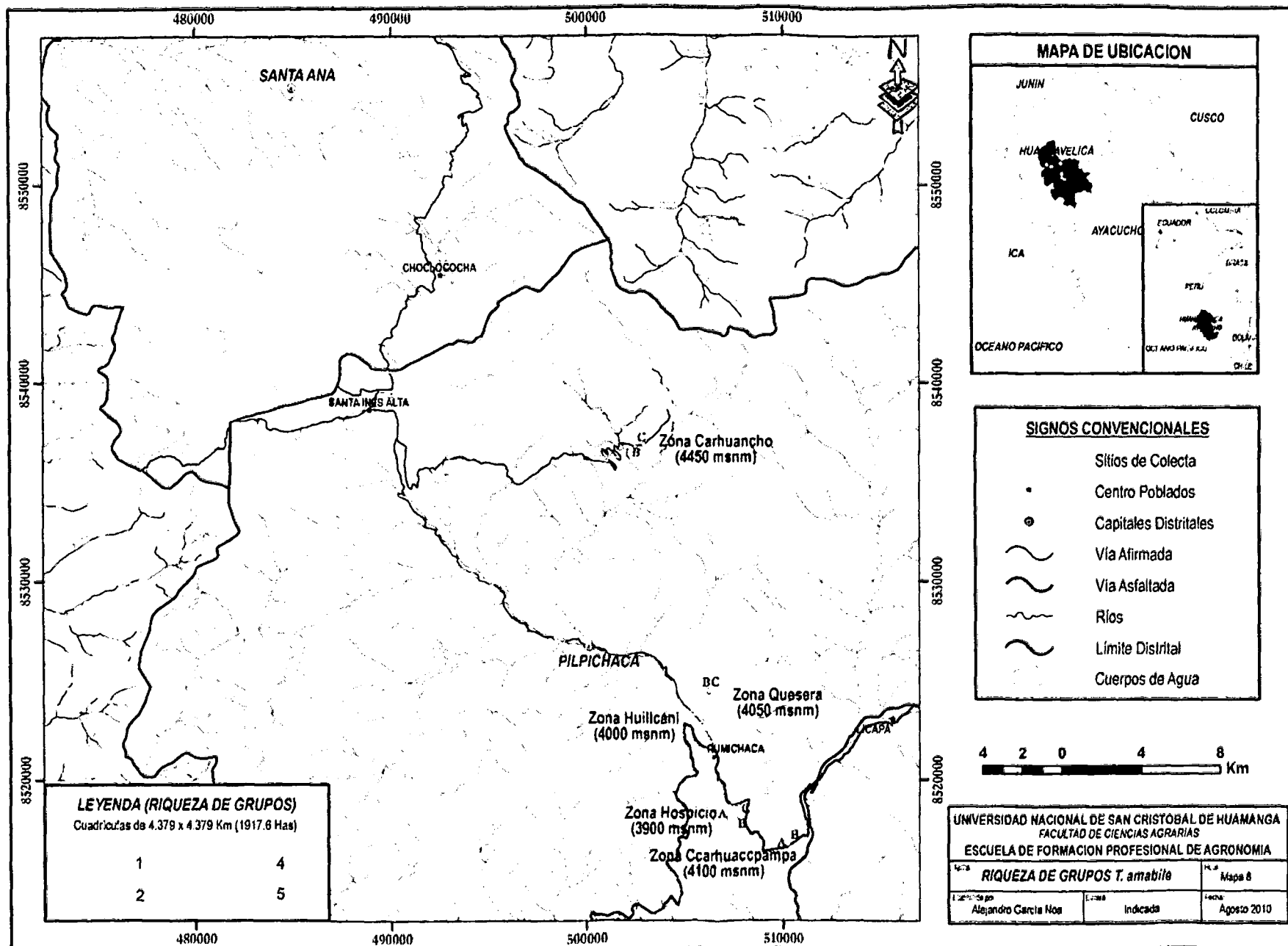
3.5.4. Distribución geográfica

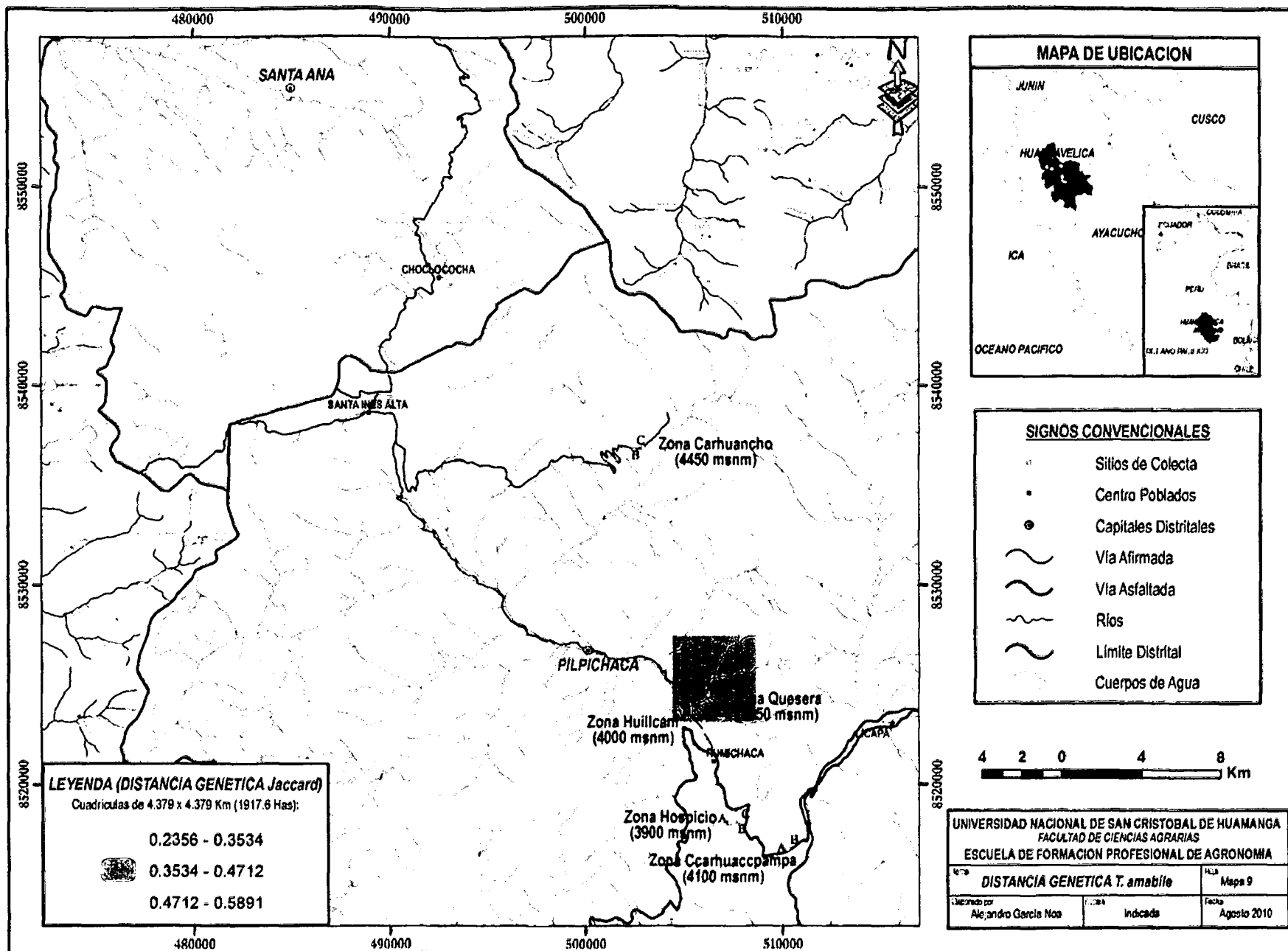
a. Riqueza de grupos

La distribución espacial en la zonas de estudio, mediante el programa DIVA-GIS 5.2 con apoyo del GIS ArcView 3.3, reafirma que la mayor riqueza de grupos le corresponden a las colectas de las zona ecológica de Ccarhuaccpampa en dichas zonas se logra ubicar 5 grupos genéticos diferentes en cuadrículas de 1917.6 Has, seguido por Hospicio y Quesera en donde se logra ubicar 4 grupos (**Mapa 08**).

b. Distancia genética

Los valores de distancia genética se encuentran de 0.236 a 0.589, lo que significa una diversidad genética media. Las colectas de las zonas de Ccarhuaccpampa y Hospicio poseen los mayores valores de distancia genética (0.471 a 0.589). Las colectas de las zonas de Huillcani y Carhuancho presentan los menores valores de distancia genética (0.236 a 0.353) en cuadrículas de 1917.6 has (**Mapa 09**).





DISCUSION

Existen pocos antecedentes de la aplicación de marcadores moleculares al estudio de la variabilidad genética en especies forrajeras nativas altoandinas. Sin embargo, algunos estudios con marcadores moleculares, tipo AFLP, han sido realizados en otras especies de gramíneas y leguminosas para determinar la diversidad genética existente (Morales *et al*, 2006).

El estudio de la diversidad genética de pastos nativos altoandinos, mediante AFLP con seis combinaciones de iniciadores, se obtuvo un total de 1100 marcadores AFLP, de las cuales el 52.3% fueron polimórficos (575 fragmentos). Los fragmentos variaron dependiendo de la especie; se obtuvo un mínimo de 93 para *Trifolium amabile* y un máximo de 202 para *Festuca dolichophylla*.

Mian *et al* (2002), en *Festuca arundinacea* Schreb, obtuvieron un total de 461 bandas con seis combinaciones de iniciadores, de las cuales 56.6% (261 bandas) fueron polimórficas y los rangos variaron de 33 a 61 bandas polimórficas; mientras tanto, en *Festuca dolichophylla* se obtuvo menor número de bandas polimórficas (202 bandas), cuyo rango fue de 21 a 46 bandas polimórficas.

Morales *et al* (2006), realizaron el estudio de la caracterización de la diversidad de la especie *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. (familia Poaceae), mediante marcadores moleculares AFLP, detectando 281 bandas y 36.6% fueron polimórficas para 5 combinaciones similares a este estudio. Vergara y Bughrara (2004), detectaron de 100 a 150 bandas, con 22 a 94 bandas polimórficas en la especie *Agrostis stolonifera* var. *Palustris* de la familia Poacea. Fu *et al* (2004), al evaluar *Schizachyrium scoparius* reportaron 854 y

653 fragmentos en tallo y semilla, pero solo 158 fueron bandas polimórficas, valores parecidos a los de las poblaciones de las especies forrajeras nativas altoandinas evaluadas.

Lo anterior indica una amplia variabilidad para polimorfismo, según los marcadores de AFLP, para los diferentes pastos.

Existen otros estudios en pastos con marcadores moleculares RAPD como el de Bolaric *et al* (2005), que reportaron para 440 individuos de 22 cultivares de *Lolium perenne* L. de la familia gramínea y obtuvieron 165 bandas polimórficas y 12 bandas en promedio por combinación de iniciador. Alonso (2003), para 8 entradas (4 tetraploides, 3 pentaploides y un hexaploide) con 11 oligonucleótidos, obtuvo 123 marcadores RAPS y 90 de ello fueron polimórficos, los que posibilitaron la diferenciación completa de los 8 clones.

Las 6 combinaciones de iniciadores presentaron niveles de polimorfismo altos que van de 39.3% a 60%. Estos valores nos indican la eficiencia de los marcadores moleculares AFLP para analizar la diversidad genética de los pastos nativos altoandinos. Estos niveles de polimorfismo son similares a lo reportado por Morales *et al* (2006), para muestras de pastos nativos *Bouteloua curtipendula* Michx.Torr. mediante marcadores de AFLP quienes reportaron 36.6% de polimorfismo.

Las combinaciones de iniciadores más eficientes fueron *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA dado que detectaron mayor número de marcadores polimórficos en todas las especies forrajeras nativas. La primera combinación detectó de 19 para *Trifolium amabile* a 44 para *Festuca dolichophylla* y la segunda combinación detectó de 14 para *Trifolium amabile* a 46 para *Festuca dolichophylla*. En el estudio de la especie *Bouteloua*

curtipendula Michx.Torr. usando 5 combinaciones similares, también se detectaron mayor número de marcadores con ambas combinaciones; 20 fueron polimórficas para la combinación de iniciadores *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y 20 para *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA (Morales *et al*, 2006). Sin embargo, para la especie *Trifolium amabile* se detectaron un mayor número de marcadores monomórficas que polimórficas con las combinaciones de iniciadores utilizadas en este estudio. Es probable que estas combinaciones de iniciadores no detecten modificaciones en la secuencia de ADN que comprende los sitios de corte de las enzimas de restricción en la leguminosa.

Las poblaciones de las especies forrajeras nativas altoandinas crecen y se desarrollan en ambientes con características muy extremos y variables (Tabla 2-2, Tabla 2-3 y Figura 2-1), los drásticos cambios climáticos (temperatura y precipitación principalmente), variables características físico-químicas de los suelos y trastornos geológicos tendrían un rol crucial en la formación de las relaciones genéticas entre las poblaciones actuales. Por ello, el elevado número de bandas polimórficas exclusivas detectados en las 4 especies *Festuca dolichophylla* (38), *Poa perligulata* (13), *Muhlenbergia ligularis* (29) y en menor número para *Trifolium amabile* (7) en las diferentes zonas ecológicas será a causa de escaso flujo de genes por lo que habría diferentes marcadores en las diferentes zonas ecológicas, probablemente cada zona ecológica conserve algunas características propias.

La diversidad genética es necesaria para que las poblaciones (animales o vegetales) puedan adaptarse a los cambios ambientales. De las cuatro especies nativas altoandinas analizadas, los índices de diversidad genética variaron de 0.241 para *Muhlenbergia ligularis* a 0.341 para *Poa perligulata*,

estos índices podrían ser bajos debido a que no existen reportes de niveles de diversidad en las especies utilizadas en este estudio. Estos niveles bajos de diversidad genética de una especie pueden ser explicados por características del hábitat o bien pueden reflejar los eventos ambientales históricos que han sucedido en la región que ocupa. Las poblaciones de organismos que habitan ambientes similares, cuando existe un elevado intercambio génico se mantienen genéticamente homogéneas. En otro caso, si las características ambientales entre poblaciones son heterogéneas, tienen diferentes niveles de estrés por contaminación o presentan un reducido intercambio génico entre sí, presentarán diferencias en su estructuración genética (Torres, 2001).

Los análisis de agrupamiento UPGMA de las especies forrajeras muestra la conformación de los grupos *Festuca dolichophylla* (11), *Poa perligulata* (6), *Muhlenbergia ligularis* (9) y *Trifolium amabile* (8) con valores promedio de similitud que dan una referencia de un nivel medio de diversidad genética, ratificado por la representación de las colectas en el espacio bidimensional no métrico. Los grupos de *Festuca dolichophylla* encierran colectas de una misma zona, lo que hace suponer que la especie mantiene características exclusivas que no comparte con las otras en las zonas ecológicas; esto es reforzado por el mayor número marcadores exclusivos detectados, manteniendo características propias de la zona evidenciando el escaso flujo de genes. Los grupos de *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile* encierran colectas de varias zonas ecológicas, por tanto estas especies conservan marcadores comunes en las zonas ecológicas. En la especie *Poa perligulata* se detectó individuos con similitud uno (PHC-16 y PHC-18) que podrían ser el mismo individuo debido a la cercanía de la colecta. En

Trifolium amabile se detectaron el menor número de marcadores AFLP exclusivos (2) en comparación de las demás especies, lo que hace suponer que existe un flujo de genes de zona a otra. Tuttobene y col (2007), en un estudio de caracterización de poblaciones nativas de *Trifolium spp.* no encontró interacciones interesantes entre ecotipos y la altitud. Al parecer la altitud podría ser un factor importante para la agrupación observada en función de su similitud genética, es probable que los grupos únicos sea una consecuencia derivada de la formación de una nueva población de individuos a partir de un número muy reducido de éstos, debido a la fisiología y crecimiento de la especie. Por tanto, las variaciones genéticas estarían relacionadas a las distancias geográficas y altitud entre las zonas ecológicas.

El análisis de distribución espacial, confirmó los enunciados antes explicados de diversidad genética de las especies forrajeras nativas, debido a que el programa DIVA-GIS representa la distribución geográfica de los grupos ya definidos por el método de agrupamiento UPGMA en cuadrículas de 119.8, 1078.5, 1917.6 y 2995.4 Has dependiendo de la mejor representación. Las zonas ecológicas de mayor riqueza de grupos y diversidad genética fueron para Carhuancho, seguido por Ccarhuaccpampa. En particular, Santa Inés sería para la especie *Poa perligulata*.

CAPITULO IV

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

CONCLUSIONES

Los análisis indican que existe un nivel medio de diversidad genética en las poblaciones de pastos nativos altoandinos *Festuca dolichophylla*, *Poa perligulata*, *Muhlenbergia ligularis* y *Trifolium amabile*.

1. Es notorio la diversidad genética intrapoblacional en las especies forrajeras nativas altoandinas, evidenciada por los valores medio de índices de similitud Jaccard y el agrupamiento que encierran individuos de varias zonas ecológicas.

2. La agrupación de poblaciones de una misma zona ecológica con valores de similitud bajos (*Festuca dolichophylla*) y la formación de grupos por colectas de varias zonas en los demás especies, demostraría la diversidad genética interpoblacional, entre zonas ecológicas.
3. El análisis espacial reveló a Santa Inés, Carhuancho y Ccarhuaccpampa como las zonas ecológicas de mayor diversidad genética de las especies forrajeras nativas altoandinas; muestran esquemáticamente un panorama geográfico de la riqueza de la diversidad genética en el área de colecta similar o igual a lo encontrado en los demás análisis.
4. Los marcadores AFLP utilizados demostraron ser eficientes en el análisis de la diversidad genética de las especies forrajeras nativas altoandinas y en las especies como *Festuca dolichophylla* y *Muhlenbergia ligularis* suficientes para discriminar grupos homogéneos diferenciados por zonas ecológicas.
5. Las mejores combinaciones de iniciadores fueron *EcoRI*-AGG + *MseI*-CTG y *EcoRI*-ACA + *MseI*-CGA, dado que reportaron el mayor número de bandas polimórficas, especialmente en las especies de la familia Poaceae.
6. La presencia de un alto número de marcadores AFLP exclusivos para las especies de pastos nativos altoandinos nos hace presumir que el flujo génico es escaso y que se pueden detectar colectas de las zonas ecológicas que comparten características propias, a excepción de la especie *Trifolium amabile*.

RECOMENDACIONES

1. Continuar el estudio con más individuos por zonas ecológicas o ampliar la recolección a otras zonas altoandinas de las Regiones del Perú para obtener mayor información del grado de diversidad genética y realizar la caracterización morfológica y fisiológica de la población. La relación entre la información genética y los caracteres morfológicos, permitiría desarrollar en un futuro un mapa genético.
2. El análisis de diversidad genética de pastos nativos altoandinos será más eficiente al utilizar mayor número de combinación de iniciadores de los ya analizadas. Con esta introducción a la diversidad genética de especies forrajeras nativas altoandinas, abordar análisis complementarios con caracterización molecular con marcadores codominantes (SSR) para determinar la diversidad genética en base a la heterocigosidad de los loci.
3. Realizar la investigación, si los marcadores hallados están ligados a genes que se manifiestan como características agronómicas de interés, para contar con grupos de colectas que puedan ser usadas para mejoramiento genético.
4. Estas 4 especies de pastos nativos altoandinos son importantes para la ganadería altoandina alpacuno, por lo que constituyen un recurso genético valioso que se debe estudiar para mejorar su potencial productivo, uso y conservación. La construcción de programas de mejoramiento orientados al desarrollo de cultivares mejorados adaptados a los estreses ambientales, asistidos por el conocimiento de productores y extensionistas sobre los agrosistemas, podría ser una estrategia factible para incrementar la productividad de las áreas de pastoreo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALBANY, N.; VILCHEZ, J.; NAVA, A.; GONZALEZ, M. & CASTRO, C. 1998. El análisis de conglomerado para complementar el estudio de patrones electroforéticos en *Psidium* spp. Revista de la Facultad de Agronomía-Universidad del Zulia. Proyecto cofinanciado por CONICIT N° SI-2609 y CONDES N° 1037-94. Maracaibo, Venezuela. 26 mayo 2009. http://www.revfacagronluz.org.ve/v15_2/v152z004.html
2. ALONSO, S. I. 2003. Caracterización de *Paspalum dilatatum* mediante RAPD. Unidad integrada. Facultad de Ciencias Agrarias, UNMdP/EEA INTA, Balcarce Argentina. <http://www.botanicargentina.com.ar/boletin/38/241-genetica.pdf>
3. AQUINO, Y. 2007. Análisis de Diversidad Genética y Distribución Espacial del Germoplasma de *Manihot esculenta* crantz (yuca) en Ucayali-Perú, mediante marcadores SSR. Tesis para optar el Título Profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín, Arequipa-Perú.
4. AZOFEIFA, A. 2006. Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicación en Frutales de Trópico. CIGRAS. Facultad de Ciencias Agroalimentarias, Universidad de Costa Rica. Costa Rica. pp 222-236. 20 enero 2007. http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_Mesoamerican
[a/Vol.%2017\(2\)%202006/rev_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf](http://www.eefb.ucr.ac.cr/Revistas/Agronomia_Mesoamerican/Vol.%2017(2)%202006/rev_bibliografica/Azofeifa-marcadores.pdf)
5. BECERRA, V. & PAREDES, M. 2000. Uso de Marcadores Bioquímicos y Moleculares en Estudios de Diversidad Genética. *Agricultura Técnica*. Chile. Vol. 60 (3): p 270-281.
6. BOLARIC, S.; BARTH, S.; MELCHINGER, A. E. & POSSELT, K. 2005. Genetic diversity in European perennial ryegrass cultivars investigated with RAPD markers. *Plant Breeding* 124: 161-166.
7. BRUCE, A.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; KEITH, R. & PETER, W. 2003. *Biología Molecular de la Célula*. Cuarta Edición. Ediciones Omega. Barcelona-España. 1463 p.

8. CIP. 1997. Molecular Biology Laboratory Protocols: Plant Genotyping. Centro Internacional de la Papa. La Molina, Lima-Perú.
9. CENIS, J. L. 2000. Nuevas Técnicas Moleculares para la Identificación Varietal de Plantas. Terralia, Cida: La Alberca. Vol. 12, p. 40-43.
10. CRONQUIST, A. 1988. THE EVOLUTION AND CLASSIFICATION OF FLOWERING PLANTS. 2^{da} Edic. Edit. The New York Botanical Garden. NEW YORK-USA.
11. CROSSA, J.; FRANCO, J.; RIBAUT, J.; BETRAN, J.; WARBURTON, M. & KHAIRALLAH, M. 2001. A method for combining molecular markers and phenotypic attributes for classifying plant genotypes. Theoretical and Applied genetics 103: 944-952.
12. DUQUE, M. C. 1998. Introducción al análisis de datos moleculares. Manual de capacitación. Edit. CIAT. Cali-Colombia.
13. DURAND, F. 2008. Fenología de diez especies de pastos naturales de los pastizales alto andinos de la comunidad de Ccarhuaccpampa, Ayacucho. Tesis para optar el título profesional de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de San Cristóbal de Huamanga. Ayacucho, Perú.
14. ECHENIQUE, V.; RUBINSTEIN, C. & MROGINSKI, L. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ediciones INTA. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. 424 p. www.inta.gov.ar/ediciones/2004/biotec/biotec.htm-16k
15. FAO. 2003. Glossary on Forest Genetic Resources. Edit. IUFRO. Rome-Italy. p. 89.
16. FELSENSTEIN, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 789-791.

17. FERREIRA, M. E. & GRATTAPAGLIA D. 1998. Introducción al Uso de Marcadores Moleculares en el Análisis Genético. Primera Edición. EMBRAPA-CENARGEN. Brasília-Brasil. 222 p.
18. FU, Y. B.; FERDINANDEZ, S. N.; PHAN, A. T.; COULMAN, B. E. & RICHARDS, K. W. 2004. Genetic diversity in natural populations and corresponding seed collections of little bluestem as revealed by AFLP markers. *Crop Sci.* 44: 2254-2260.
19. FLOREZ, A. 2005. Manual de Pastos y Forrajes Altoandinos. ITDG AL, OIKOS. Lima-Perú. 53 p.
20. HIJMANS, J.; GUARINO, L.; BUSSINK, C.; MATHUR, P.; CRUZ, M.; BARRANTES, I. & ROJAS, E. 2004. Sistema de información geográfica para el análisis de datos de distribución de especies. Manual. Versión 4 auspiciado por International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) y UC Berkeley Museum of Vertebrate Zoology. Lima, Perú. p 83.
21. INVITROGEN Life technologies. 2003. AFLP Analysis System I, AFLP Starter Primer Kit. Catalog nos. 10544-013 and 10483-014. Version B.
22. IPGRI. 2003. Tecnologías de Marcadores Moleculares para Estudios de Diversidad Genética de Plantas: Tecnologías Basadas en el ADN. Módulo de Aprendizaje. Cornell University. 26 noviembre 2006. http://www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL1/IV.3.pdf
23. IPGRI. 2004. Medidas de la Diversidad Genética: Análisis de la Diversidad Genética Utilizando Datos de Marcadores Moleculares. Módulo de Aprendizaje. Cornell University. 26 mayo 2009. http://www.ipgri.cgiar.org/training/Unit10-1/MolMarkers_es/PDF/VOL2/III.%20Medida%20de%20la%20diversidad%20gen%C3%A9tica.pdf
24. JACCARD, P. 1908. Nouvelles recherches sur la distribution florales. *Bull. Soc. Vaudoise Sci. Natl.* 44: 223-270.

25. KARP, A. & 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.
26. KARP, A.; KRESOVICH, S.; BHAT, K.; AYAD, W. & HODGKIN, T. 1997. Molecular tools in plant genetic resources conservation: a guide to the technologies. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Roma Italia. 47p.
27. LOPEZ, C. 2002. Marcadores Moleculares: curso de Genética Molecular. Departamento de Biología. Universidad Nacional Agraria La Molina. Lima-Perú.
28. MAGURRAN, A. E. 1988. *Ecological diversity and its measurement*. Princeton University Press, New Jersey, 179 pp.
29. MARSHALL, D. & BROWN, A. 1975. Optimum sampling in genetic conservation. In Genetic resources for today and tomorrow (O.H. Frankel and J.G. Hawkes, eds.) Cambridge University Press. Cambridge, UK. pp 53-80.
30. MARTINEZ, A. & VEGA, J. L. 2002. Estudios de variación genética utilizando microsatélites de ADN. Unidad de Veterinaria, Departamento de Genética, Universidad de Córdoba y Laboratorio de Genética Molecular- Servicio de Cría Caballar. Córdoba España.
31. MIAN, A. T.; HOPKINS, A. & ZWONITZER, J. 2002. Determination of genetic diversity in Tall Fescue with AFLP markers. Crop Sci. 42: 944-950.
32. MORALES, C.; QUERO, A.; LE, O.; HERNANDEZ, A.; PEREZ, J. & GONZALEZ, S. 2006. Caracterización de la Diversidad del Pasto Nativo *Bouteloua curtipendula* Michx. Torr. mediante Marcadores de AFLP. INIFAP-CIRNOC. Campo Experimental La Campana. México. pp 711-720. 26 febrero 2007. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2006/nov-dic/art-3.pdf>
33. MORENO, C. E. 2001. Métodos para medir la biodiversidad. M&T-Manuales y Tasis SEA, Vol. 1. Zaragoza, España. 84 pp.

34. MOSTACERO, J.; MEJÍA, F. & GAMARRA, O. 2002. Taxonomía de las Fanerógamas Útiles del Perú. Editora Norma Legales. Concytec. Trujillo-Perú. 996 p.
35. NEI, M. 1973. Analysis of gene diversity in subdivided populations. Proceedings of the National Academy of Science of the USA. 70: 3321-3323.
36. NEI, M. & LEI, W. 1979. Mathematical model of studying genetic variation in terms of restriction endonucleasas. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76: 5269-5273.
37. NUEZ, F. & CARRILLO, M. 2000. Los Marcadores Genéticos en la Mejora Vegetal. Sociedad Española de Genética. S. E. de Ciencias Hortícolas. Universidad Politécnica de Valencia. España. Ed. U. P. U. p. 579.
38. PADILLA, C., MARTÍNEZ, E., BÁRCENA, J. y GARCÍA, C. 2006. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa. Aislamiento y caracterización electroforética de ADN plasmídico. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus Universitario de Rabanales. Edificio Severo Ochoa, 14071-Córdoba. <http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/17%20ELECTROFORESIS%20ACS%20NUCLEICOS%20GELES%20AGAROSA.pdf>
39. QUEVEDO, R. 1993. Metodología para el estudio de fincas. Aproximación multivariada. Revista de la Facultad de Agronomía de la Universidad Central de Venezuela. Alcance 44, Maracay, Venezuela. pp: 115-321.
40. RALLO, P.; BELAJ, A.; DE LA ROSA, R.; TRUJILLO, I. 2002. MarPadores moleculares (en línea). Córdoba, España. Consultado 1 ago. 2002. Disponible en http://www.extremadura21.com/caudal/hemeroteca/mayo-junio_2000/almazara/almazara1.htm
41. RIMACHI, L. F. 2005. Análisis de la variabilidad genética y distribución espacial de *Arachis hypogaea* L. (maní) colectados en las cuencas de Ucayali, Aguaytía y San Alejandro en la región Ucayali-Perú, mediante marcadores AFLP. Tesis para optar el título profesional de Biólogo. Universidad Nacional de San Agustín. Arequipa, Perú.

42. ROHLF, F. J. 1993. NTSYSpc. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter Software. New York. E.E.U.U.
43. ROHLF, F. J. 2000. NTSYSpc. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. Version 2.1. Exeter Software. Department of Ecology and Evolution State University of New York Stony Brook, NY 11794-5245.
44. SIDTA. 1999. Los marcadores moleculares en ingeniería genética y en mejora vegetal. España. Consultado 1 agosto 2002. Disponible en: <http://www.jcyl.es/jcyl/cag/dgiadr/svidta/boletin/dic99/bold.html#los%20marcadores%20moleculares%20en%20ingenieria%20genetica>
45. SILVESTRE, R. C. 2008. Análisis de la variabilidad genética de alpacas (*Lama pacos*) provenientes de la provincia de Lampa-Puno usando marcadores moleculares tipo microsatélites. Tesis para optar el título de Licenciado en Biología. Universidad Nacional Federico Villarreal. Lima, Perú.
46. SMITH, J.; CHIN, E.; SHU, L.; SMITH, O.; WALL, S.; SENIOR, M.; MITCHELL, S.; KRESOVICH, S. & ZIEGLE, J. 1997. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree. Theoretical and Applied Genetics. 95: 163-173.
47. TAKHTAJAN, A. L. 1980. OUTLINE OF THE CLASIFICATION OF FLOWERING PLANTS (MAGNOLIOPHYTA). The Botanical Review 46(3): 225-359.
48. TAPIA, M. & FLORES, J. 1984. Pastoreo y Pastizales de los Andes del Sur del Perú. Servicios Editoriales Adolfo Arteta. Lima-Perú. 321 p.
49. TORALES, S.; ZELENER, N.; LOPEZ, G.; PATHAUER, P. & MARCUCCI, S. 2002. Uso de AFLP para Determinar los Posibles Orígenes de Razas Locales. CNIA, INTA Castelar. Argentina. pp 143-146. 26 noviembre 2006. <http://www.inta.gov.ar/ediciones/idia/forest/genetica01.pdf>
50. TORRES, J. 2001. Estrategia y plan de acción de la Biodiversidad para el departamento de Ayacucho como base de su desarrollo sostenible. Convenio

de cooperación técnica no reembolsable ATN/JF-5887-RG. Comunidad Andina Banco Interamericano de Desarrollo.

51. TOVAR, O. 1993. Las Gramíneas (Poaceae) del Perú. Tomo 13. RUIZIA-FARESO S. A. Madrid-España. 480 p.
52. TOVAR, O & OSCANOVA, L. 2002. Guía para la identificación de pastos naturales alto andinos de mayor importancia ganadera. Instituto de Montaña, proyecto FOCAL Obc. Primera edición. Huaraz, Perú. p.184.
53. VAN P. & WACHTER, R. (1997) Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. Comput. Applic. Biosci. 13, 227-230.
54. VERGARA, G.V. & BUGHRARA, S. 2004. Genetic differentiation of tetraploid creeping bentgrass and hexaploid redtop bentgrass genotypes by AFLP and their use in turfgrass breeding. Crop Sci. 44: 884-890.
55. VILELA, E.; CANDEIRA, A. & LOURENCO, L. 1997. Recursos genéticos vegetales. Edit. EMBRAPA. Brasil.
56. VAN P. & WACHTER, R. (1997) Construction of evolutionary distance trees with TREECON for Windows: accounting for variation in nucleotide substitution rate among sites. Comput. Applic. Biosci. 13, 227-230.

ANEXO 1

Datos de recolección de las 120 colectas de las 4 especies forrajeras nativas alto andinas

ESPECIE: *Festuca dolichophylla*. N. V. "Chilligua", "Huaylla-ocsha"

Código colecta	Dpto.	Provincia	Distrito	Zona	Sitio	Fecha colecta	Latitud	Longitud	Altitud
FSI-1	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	28/03/08	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
FSI-2	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	29/08/07	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
FSI-3	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
FSI-4	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
FSI-5	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	28/03/08	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
FSI-6	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	28/03/08	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
FPC-7	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	29/08/07	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
FPC-8	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	29/08/07	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
FPC-9	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	29/08/07	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
FPC-10	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	29/08/07	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
FPC-11	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	28/03/08	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
FPC-12	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	28/03/08	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
FCH-13	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
FCH-14	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
FCH-15	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
FCH-16	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
FCH-17	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
FCH-18	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
FHL-19	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
FHL-20	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
FHL-21	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
FHL-22	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
FHL-23	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
FHL-24	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
FCC-25	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
FCC-26	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
FCC-27	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
FCC-28	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4112
FCC-29	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/08/07	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4112
FCC-30	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/08/07	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4112

ESPECIE: *Poa perligulata*

Código colecta	Dpto.	Provincia	Distrito	Zona	Sitio	Fecha colecta	Latitud	Longitud	Altitud
PSI-1	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	28/03/08	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
PSI-2	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	28/03/08	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
PSI-3	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
PSI-4	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
PSI-5	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	28/03/08	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
PSI-6	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	29/08/07	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
PPC-7	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	28/03/08	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
PPC-8	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	28/03/08	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
PPC-9	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	29/08/07	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
PPC-10	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	28/03/08	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
PPC-11	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	28/03/08	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
PPC-12	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	29/08/07	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
PHC-13	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	A	30/08/07	13°15'31.5"	75°04'55.5"	4516
PHC-14	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	A	30/08/07	13°15'31.5"	75°04'55.5"	4516
PHC-15	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	A	30/08/07	13°15'31.5"	75°04'55.5"	4516
PHC-16	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	B	30/08/07	13°15'28.5"	75°04'55.0"	4529
PHC-17	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	B	30/08/07	13°15'28.5"	75°04'55.0"	4529
PHC-18	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huaracco	B	30/08/07	13°15'28.5"	75°04'55.0"	4529
PCH-19	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
PCH-20	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
PCH-21	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
PCH-22	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
PCH-23	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
PCH-24	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
PQE-25	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
PQE-26	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
PQE-27	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
PQE-28	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
PQE-29	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
PQE-30	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Qesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079

ESPECIE: *Muhlenbergia ligularis*. N. V. "Atun-chiji", "Grama blanca"

Código colecta	Dpto.	Provincia	Distrito	Zona	Sitio	Fecha colecta	Latitud	Longitud	Altitud
MSI-1	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	28/03/08	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
MSI-2	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	A	28/03/08	13°13'35.9"	75°09'07.3"	4655
MSI-3	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
MSI-4	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	B	28/03/08	13°13'42.2"	75°08'41.2"	4660
MSI-5	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	28/03/08	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
MSI-6	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Santa Inés	C	28/03/08	13°13'41.5"	75°08'20.1"	4662
MPC-7	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	28/03/08	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
MPC-8	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	A	28/03/08	13°05'49.6"	75°03'32.1"	4735
MPC-9	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	28/03/08	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
MPC-10	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	B	28/03/08	13°05'44.5"	75°03'35.1"	4737
MPC-11	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	28/03/08	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
MPC-12	Huancavelica	Castrovirreyna	Santa Ana	Pultocc Chico	C	28/03/08	13°05'48.6"	75°03'42.1"	4732
MCH-13	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
MCH-14	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	A	29/03/08	13°13'11.8"	74°57'41.0"	4425
MCH-15	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
MCH-16	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
MCH-17	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
MCH-18	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
MHL-19	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
MHL-20	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
MHL-21	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
MHL-22	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
MHL-23	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
MHL-24	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
MCC-25	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/08/07	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
MCC-26	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/08/07	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
MCC-27	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/08/07	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
MCC-28	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102
MCC-29	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102
MCC-30	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102

ESPECIE: *Trifolium amabile*. N. V. "trébol", "layo"

Código colecta	Dpto.	Provincia	Distrito	Zona	Sitio	Fecha colecta	Latitud	Longitud	Altitud
TCH-1	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
TCH-2	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
TCH-3	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	B	29/03/08	13°14'07.3"	74°58'23.8"	4445
TCH-4	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
TCH-5	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
TCH-6	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Carhuancho	C	29/03/08	13°14'10.5"	74°58'38.4"	4469
THL-7	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
THL-8	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	A	30/03/08	13°21'49.9"	74°56'40.9"	3988
THL-9	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
THL-10	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	B	30/03/08	13°21'46.4"	74°56'36.3"	4014
THL-11	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
THL-12	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Huillcani	C	30/03/08	13°21'35.7"	74°56'41.7"	4004
TCC-13	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
TCC-14	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
TCC-15	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	A	30/03/08	13°25'16.1"	74°54'41.1"	4088
TCC-16	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102
TCC-17	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102
TCC-18	Ayacucho	Cangallo	Paras	Ccarhuaccpampa	B	30/03/08	13°25'03.3"	74°54'20.0"	4102
TQE-19	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
TQE-20	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	A	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
TQE-21	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	B	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
TQE-22	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	B	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
TQE-23	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	C	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
TQE-24	Huancavelica	Huaytará	Pilpichaca	Quesera	C	29/03/08	13°20'51.7"	74°56'33.9"	4079
THO-25	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	A	30/03/08	13°24'20.3"	74°55'57.9"	3914
THO-26	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	A	30/03/08	13°24'20.3"	74°55'57.9"	3914
THO-27	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	B	30/03/08	13°24'16.5"	74°55'48.4"	3947
THO-28	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	B	30/03/08	13°24'16.5"	74°55'48.4"	3947
THO-29	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	C	30/03/08	13°24'17.3"	74°55'42.1"	3971
THO-30	Ayacucho	Cangallo	Paras	Hospicio	C	30/03/08	13°24'17.3"	74°55'42.1"	3971

ANEXO 2

Equipamiento en general

2.1. En campo

Instrumental:

- ❖ Cooler, para trasladar las muestras.
- ❖ Bolsas de papel y plástico, para la recolección de muestras.
- ❖ Cinta masking, para codificar cada muestra recolectada.
- ❖ Hilos pabilo, para atar las muestras con papel periódico al masking.
- ❖ Hojas bond, libreta y lápices de registro.
- ❖ Tijera de podar, aspersor de agua, pico.

Equipos:

- ❖ Cámara fotográfica digital.
- ❖ GPS (Carmin).

2.2. En invernadero

Materiales e instrumental:

- ❖ Arena desinfectada, para preparar el sustrato.
- ❖ Compost.
- ❖ Agua para el riego de las especies forrajeras.
- ❖ Bolsas de jardinería, para trasplantar los pastos nativos.
- ❖ Cinta masking, para codificar cada muestra recolectada.
- ❖ Hojas bond, libreta y lápices de registro.
- ❖ Pala, escoba, Tijera de podar.

Equipo:

- ❖ Cámara fotográfica digital.

2.3. En laboratorio

Instrumental:

- ❖ Bidón de agua 50 L (Nalgene).
- ❖ Cajas criogénica 81 posiciones para tubos de 1.5 ml (Nalgene).
- ❖ Cinta adhesiva (Masking tape).
- ❖ Espátulas, pinzas y tijeras.
- ❖ Flotadores 20 posiciones (Sigma).
- ❖ Guantes de lates de nitrilo, látex y vinil (Kimberly Clark y Safe Skin).
- ❖ Juego de pipetores P10, P20, P200, P1000 (Rainin y Eppendorf).
- ❖ Magnetos (Fisher Scientific).
- ❖ Morteros con pilón (Goors USA 05).
- ❖ Parafilm 4 inches x 125 FT (Laboratory Film).
- ❖ Papel toalla, papel periódico y papel Watman N° 1.
- ❖ Placas de policarbonato de 96 pocillos para PCR (Axygen Scientific).
- ❖ Placas de vidrio cristal para electroforesis vertical.
- ❖ Plumones marcadores de tinta indeleble.
- ❖ Probetas, frascos, vasos de precipitación y erlermeyers 100, 250, 500 y 1000 ml (Pyrex®).
- ❖ Puntas plásticas (2, 10, 200 y 1000 µl) (Axygen Scientific).
- ❖ Rack para tubos de microcentrífuga de 1.5 y 2 ml (Axygen Scientific).
- ❖ Rack 96 pozos para tubos de 0.5, 0.6, 1.5 y 2 ml reversible (Biomol).

- ❖ Tubos para microcentrífuga eppendorf de 0.6, 1.5, 2 y 0.2 ml de capacidad (Axygen Scientific).

Equipamiento:

- ❖ Agitador magnético (CAT).
- ❖ Agitador orbital (VWR).
- ❖ Balanza analítica (A & D Company Limited, modelo 50004).
- ❖ Balanza digital (Navigator, modelo N02120).
- ❖ Baño María (Precision Scientific, modelo 188).
- ❖ Fuente poder del 250 Voltios (EC 250-90 Termo electrocorporation).
- ❖ Fuentes poder de 4000 Voltios (CBS Scientific Company, modelo EPS-3000 Serie II y Sigma-Aldrich, modelo PS 4010-2).
- ❖ Cámara de electroforesis horizontal para geles de agarosa de 250 ml (Biorad y Wealtec).
- ❖ Cámara de electroforesis vertical para geles de secuenciamiento (Gibco, Modelo S2 y CBS dual).
- ❖ Campana extractora de vapores (ESCO Modelo EFH- 4B3).
- ❖ Captador de imágenes digitales (Clear One).
- ❖ Computadora Dual Core.
- ❖ Congeladora a -20°C (Bosh modelo 260).
- ❖ Destilador (Wheaton Instruments).
- ❖ Estufa (Mettler, modelo 462034).
- ❖ Horno microondas (LG).
- ❖ Microcentrífuga refrigerada (Hettich, modelo MIRKO 22R).
- ❖ Minicentrífuga (Biorad).
- ❖ Orbital Shaker (VWR DS2 – 500 E2).

- ❖ Refrigerador a 4°C y -20°C (Frigidaire).
- ❖ Sistema de Agua Ultrapura (Barnstead-Easy pure II).
- ❖ Termobloque (VWR).
- ❖ Termocicladores (MJ. Research, modelo PTC 100 y PTC 200).
- ❖ Transiluminador UV (Bio Rad).
- ❖ Vortex (VWR).

Material químico:

- ❖ Acido acético glacial (Merck).
- ❖ Acido bórico (Sigma).
- ❖ Acrilamida (Sigma).
- ❖ Acetato de potasio (Sigma).
- ❖ ADN del fago Lambda (Sigma).
- ❖ ADN Ladder 10 pb (Invitrogen).
- ❖ Adenosin trifosfato ATP (Sigma).
- ❖ Agarosa (Sigma).
- ❖ Agua destilada y ultrapura.
- ❖ Alcohol 96%.
- ❖ Alcohol isoamílico (Merck).
- ❖ Albumina de suero bovina (Sigma).
- ❖ ARNsa (Applichem).
- ❖ Azul de bromofenol (Loba Chemie).
- ❖ Bromuro de etidio (Sigma).
- ❖ Carbonato de Sodio (Merck).
- ❖ Cloroformo (Merck).
- ❖ Cloruro de magnesio (Sigma).

- ❖ Cloruro de potasio (Applichem).
- ❖ Cloruro de sodio (Promega).
- ❖ Desoxinucleótidos (Promega).
- ❖ Dimethyldiclorosilan (Applichem).
- ❖ EDTA (ácido etilen di-amina tetra-acético) (Applichem).
- ❖ Enzima de restricción Pst I (Gibco).
- ❖ Enzimas de restricción *MseI* y *EcoRI* (Invitrogen).
- ❖ Etanol absoluto (Merck).
- ❖ Formaldehído al 37% (Merck).
- ❖ Formamida (Applichem).
- ❖ Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide (CTAB) (Sigma).
- ❖ Isopropanol (Merck).
- ❖ N-N'-methylenebisacrylamide (Sigma).
- ❖ Nitrato de plata (Ja Elmer).
- ❖ Orange G (Loba Chemie).
- ❖ p-metacriloxipropil trimetoxi silano - adhesivo (Sigma).
- ❖ Persulfato de amonio (Sigma).
- ❖ Polivinilpirrolidona (PVP) (Sigma).
- ❖ Proteinasa K (Sigma).
- ❖ Silver sequence TM DNA sequencing reagents (Promega).
- ❖ Sucrosa (Sigma).
- ❖ Syber green (Invitrogen).
- ❖ T4 DNA ligase (Invitrogen).
- ❖ Taq polimerasa y buffer 10 X (Invitrogen).
- ❖ TEMED (N, N, N', N'-Tetra-metil etilen di-amina) (Applichem).

- ❖ Tiosulfato de sodio (Scharlau).
- ❖ Tritón (Applichem).
- ❖ Trizma base (Tris hidroximetil amino etano) (Promega).
- ❖ Urea molecular (Applichem).
- ❖ Xilencianol (Sigma).

2.4. Soporte informático

Durante la realización de este trabajo, se utilizaron diversos programas informáticos de PC:

- ❖ Adobe Photoshop CS3 versión 10.
- ❖ ArcView Gis 3.3.
- ❖ Corel Draw x13.
- ❖ Diva-Gis 5.2.
- ❖ GenALEx Genetic Analysis in Excel version 6.1.
- ❖ Microsoft Office Excel 2003 y 2007.
- ❖ Microsoft Office Word 2003 y 2007.
- ❖ Microsoft Office PowerPoint 2003 y 2007.
- ❖ NTSYSpc 2.1.
- ❖ Photo Studio 2000.
- ❖ Scansoft PDF Converter Professional version 4.1.
- ❖ TREECON for Windows version 1.3b.

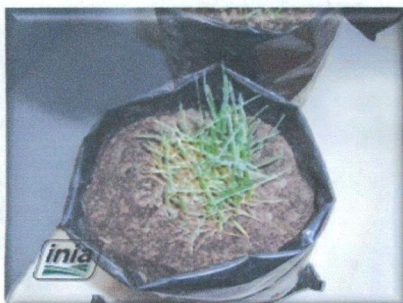
ANEXO 3

Protocolo para la extracción de ADN genómico de las especies forrajeras nativas altoandinas, según el método CTAB (CIP, 1997), modificado en el laboratorio de Biología Molecular de la SUDIRGEB-INIA

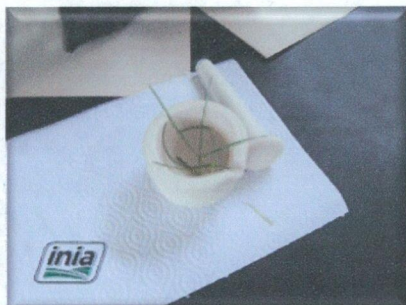
- 3.1. Traslado de las muestras de pastos altoandinos del invernadero al ambiente de extracción de ADN del laboratorio.



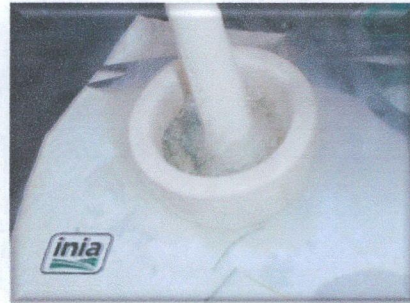
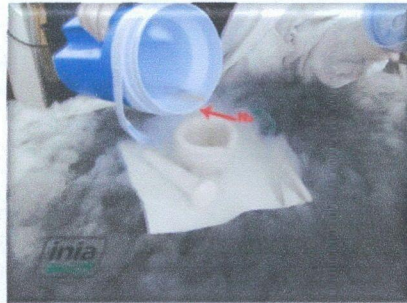
- 3.2. Limpiar y desinfectar las hojas con alcohol de 96°, luego cortar las hojas más tiernas.



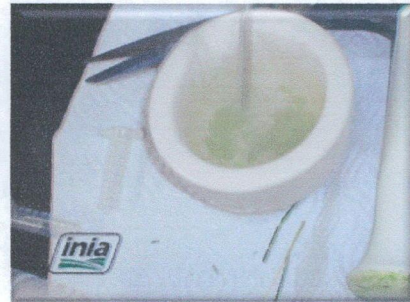
- 3.3. Colocar las hojas tiernas cortadas en un mortero pre-enfriado.



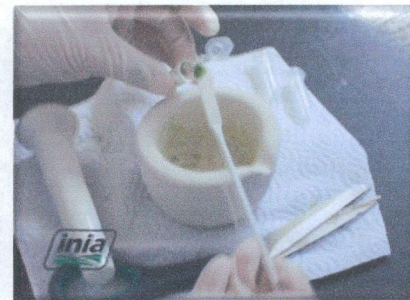
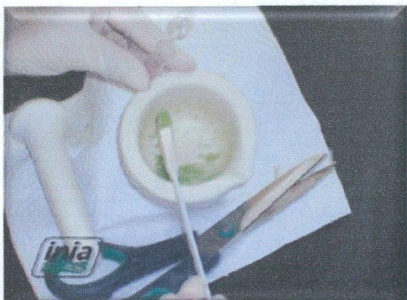
- 3.4. Agregar nitrógeno líquido al mortero hasta cubrir la muestra y presionar con el pilón suavemente.



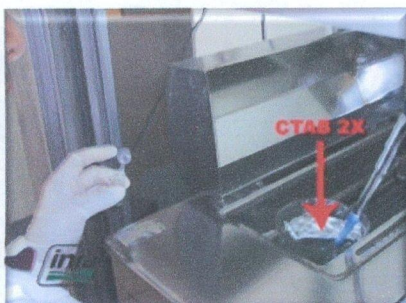
- 3.5. Triturar suavemente el tejido hasta obtener un polvo fino.



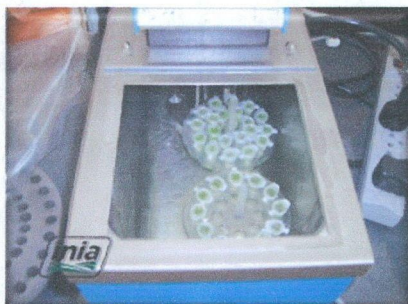
- 3.6. Colocar el polvo fino en tubos de 2 ml con ayuda de una espátula pre enfriado.



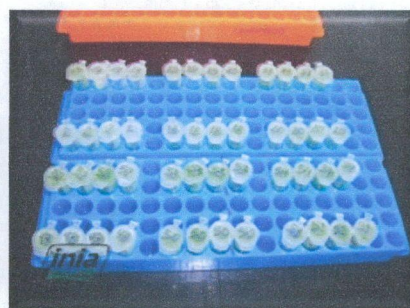
- 3.7. Agregar 700 μ l de tampón CTAB 2X y 2 μ l de β -mercaptoetanol, mezclar suavemente.



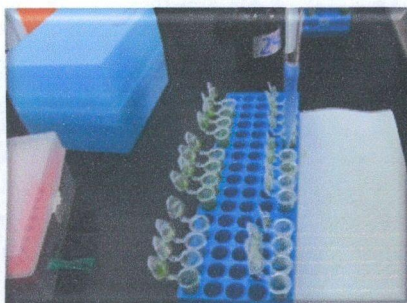
- 3.8. Incubar las muestras en baño maría a 65°C durante 45', agitándolas suavemente cada 15'.



- 3.9. Dejar las muestras a temperatura ambiente por 2'.



- 3.10. Agregar 700 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo. Mezclar suavemente por inversión.



- 3.11. Centrifugar las muestras durante 7' a 14000 rpm.



- 3.12. Transferir el sobrenadante a un tubo de 2 ml nuevo, tener cuidado de no absorber la interface. Descartar el cloroformo/alcohol isoamílico remanente en contenedores debidamente etiquetados.



- 3.13. Agregar 90 μ l de tampón CTAB 10 X (en NaCl 0.7), agitar suavemente hasta obtener una mezcla uniforme.



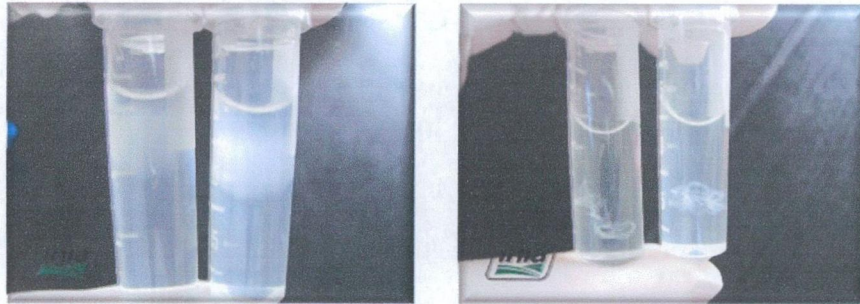
- 3.14. Agregar 300 μ l de Acetato de Potasio, agitar suavemente, luego agregar 700 μ l de cloroformo/alcohol isoamílico. Mezclar suavemente.



- 3.15. Repetir los pasos 3.11 y 3.12.



- 3.16. Agregar 700 μ l de isopropanol frío a cada tubo. Invertir los tubos varias veces y dejarlos en refrigeración por 20' a -20°C .



- 3.17. Centrifugar a 14000 rpm por 5. Eliminar el sobrenadante. Dejar que el precipitado se seque invirtiendo los tubos abiertos durante 2 minutos.



- 3.18. Lavar 2 veces el precipitado de ADN en 700 μ l de etanol 70%. Centrifugar a 14000 rpm durante 5' c/ lavado, y eliminar el etanol.



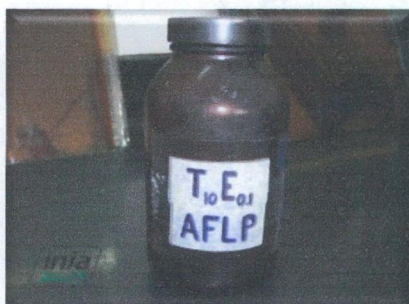
- 3.19. Lavar el precipitado de ADN en 700 μ l de etanol absoluto. Centrifugar las muestras a 14000 rpm durante 5 minutos y eliminar el etanol.



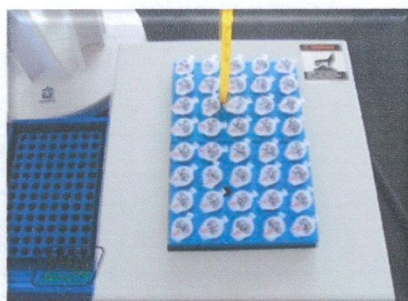
- 3.20. Dejar que el precipitado se seque toda la noche dejando los tubos abiertos invertidos.



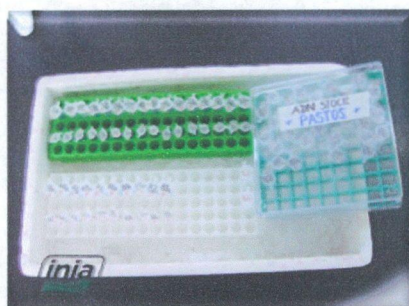
- 3.21. Disolver el precipitado de ADN en 50 μ l de $T_{10}E_{0.1}$.



- 3.22. Agregar 1 μ l de ARNasa (10 mg/ml), agitar suavemente e incubar las muestras a 37°C por 2 horas.



- 3.23. Almacenar las muestras a 4°C a mediano plazo o a -20°C a largo plazo.



ANEXO 4

Electroforesis en gel de agarosa 1%, para evaluar el ADN aislado

4.1. Preparación del molde de la cámara electroforética.



4.2. Pesar 1 g de agarosa y vaciar al matraz que contiene 100 ml de TBE 1X.



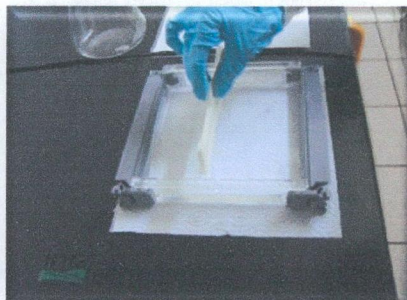
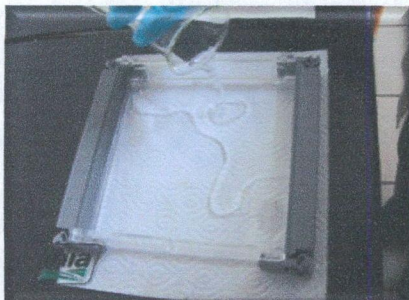
4.3. Colocar el matraz conteniendo la agarosa en el horno microondas por 3'.



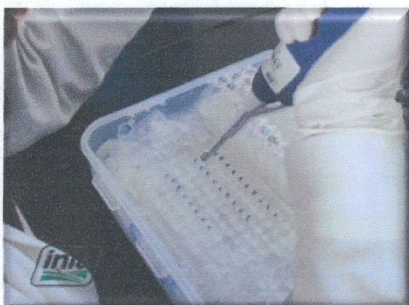
4.4. Agregar 2.5 µl de Bromuro de Etidio, mezclar suavemente.



- 4.5. Verter el gel en el molde de la cámara electroforética. Colocar los peines y dejar a temperatura ambiente por 30' hasta que gelifique.



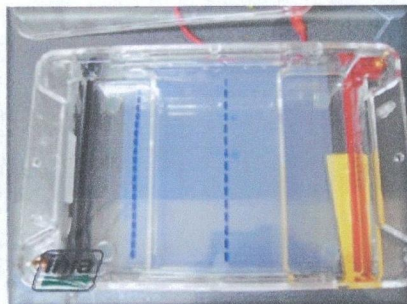
- 4.6. Mezclar suavemente 4 μ l de SALB 2X y 2 μ l de ADN de pastos nativos altoandinos en una placa.



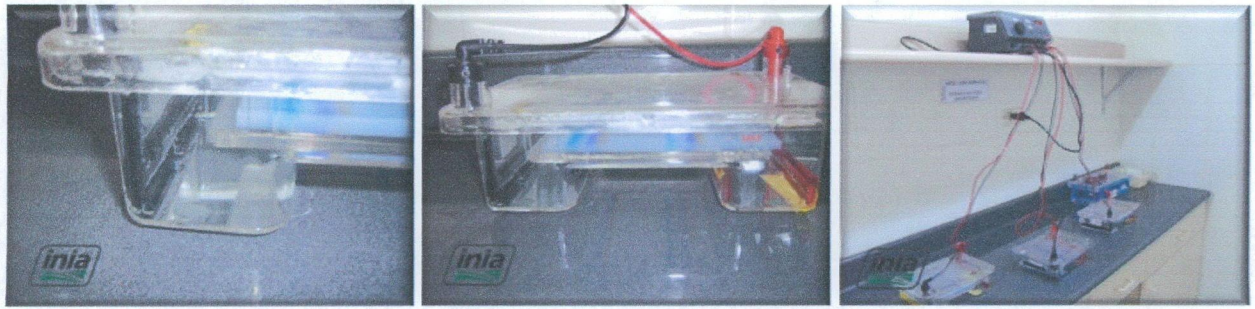
- 4.7. Colocar el molde con el gel en la cámara electroforética. Agregar buffer TBE 1X a la cámara electroforética hasta que cubra el gel.



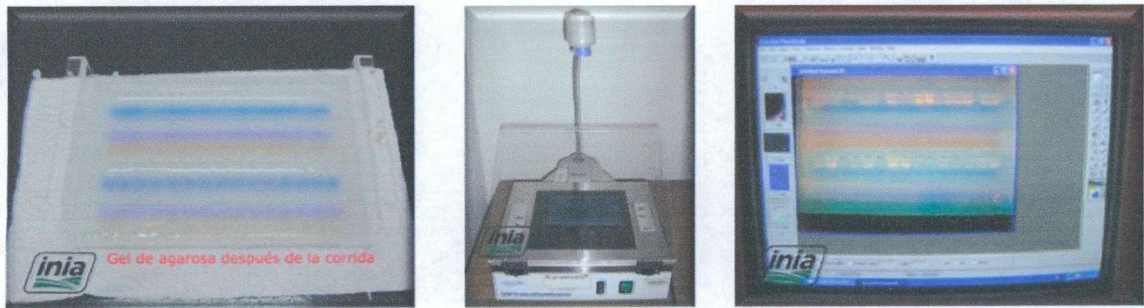
- 4.8. Cargar 6 μ l de la mezcla de ADN con SALB 2X en cada pozo del gel.



4.9. Correr el gel a 100 V por 45' aproximadamente.



4.10. Visualizar las muestras de ADN corridas en el gel de agarosa en el transiluminador de luz UV.



ANEXO 5

Preparación del gel de poliacrilamida

- 5.1. Lavar los vidrios adherente y repelente.



- 5.2. Limpiar los vidrios con alcohol de 96°C.



- 5.3. Al vidrio adherente rosearle 1.5 ml de solución adhesiva, frotar suavemente por todo el vidrio. Dejar secar por 30'.



- 5.4. En la campana extractora al vidrio repelente rosearle 300 μ l de dimethyl dicloro xylene frotar por todo el vidrio suavemente.



- 5.5. Colocar los separadores al vidrio adherente y formar un sandwich con el vidrio repelente. Sujetarlos con clamps a los costados.



- 5.6. Preparar el gel de poliacrilamida al 6 %. Mezclar 60 ml de acrilamida 6%, 360 μ l de persulfato de amonio y 36 μ l de TEMED. Agitar.



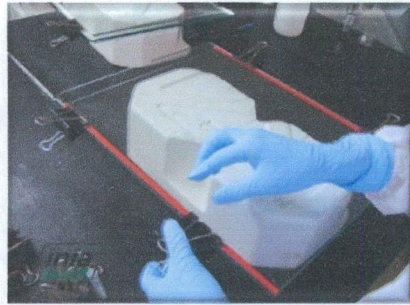
- 5.7. Verter el gel preparado al molde de vidrios y luego colocar el peine en posición invertida. Dejar el gel de poliacrilamida a temperatura ambiente hasta el día siguiente.



ANEXO 6

Electroforesis en gel de poliacrilamida 6%, para la separación de fragmentos

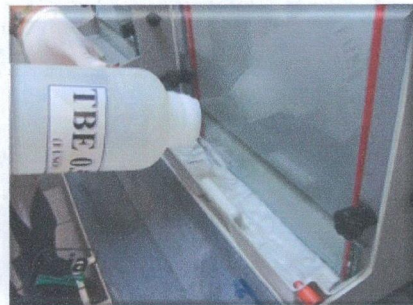
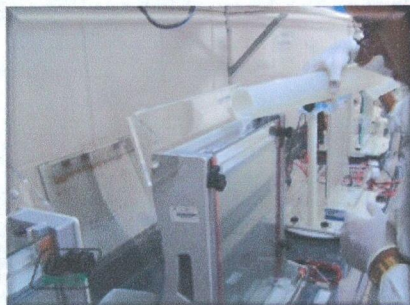
- 6.1. Quitar los clamps y peine. Limpiar el molde preparado para retirar restos de acrilamida.



- 6.2. Colocar el molde en la cámara electroforética. Ajustar el molde con las manijas de la cámara.



- 6.3. Agregar buffer TBE 0.5X a la cámara electroforética.



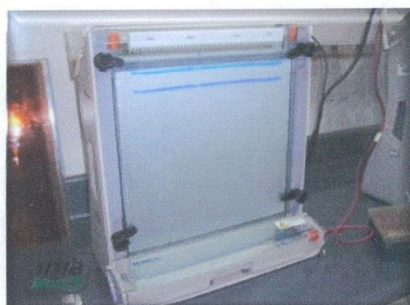
- 6.4. Realizar una pre corrida del gel a 1500 voltio por 30'. Luego limpiar el área donde se va a colocar el peine.



- 6.5. Cargar 7 μ l de las muestras previamente denaturadas en los pozos del peine.



- 6.6. Correr el gel a 1500 voltios a 100 watts y 100 mA durante un tiempo predeterminado.



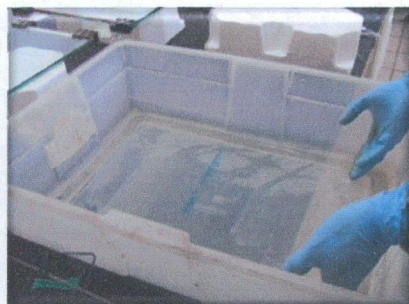
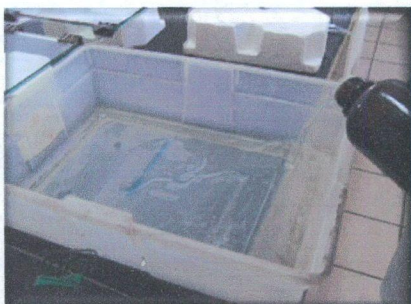
ANEXO 7

Tinción del gel de poliacrilamida

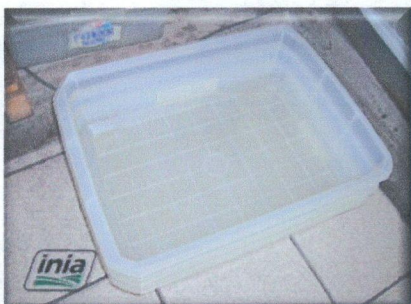
7.1. Separar el vidrio adherente con el gel del vidrio repelente.



7.2. Colocar el gel en la bandeja con el fijador por 30'.



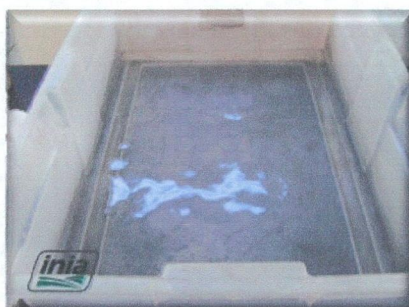
7.3. Lavar 2 veces con agua destilada fría.



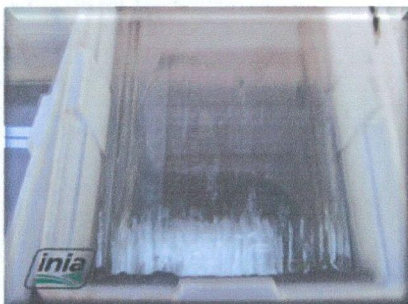
7.4. Colocar el gel en la bandeja con nitrato de plata por 30'.



7.5. Lavar por 10 segundos con agua destilada fría.



7.6. Revelar el gel en carbonato de sodio.



7.7. Detener la reacción con ácido acético. Dejar secar a temperatura ambiente.

