

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**ESCUELA DE POST GRADO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA**  
**(Chenopodium pallidicaule Aellen) CON MAYOR RENDIMIENTO EN**  
**GRANO: ALTIPLANO - PUNO**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**EVARISTO MAMANI MAMANI**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORIS SCIENTIAE EN:**

**CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

**PUNO - PERÚ**

**2013**

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO  
BIBLIOTECA CENTRAL  
AREA DE TESORO  
Fecha Ingreso: 16 OCT 2014  
Nº 100709

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO**  
**ESCUELA DE POST GRADO**  
**PROGRAMA DE DOCTORADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**



**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA**  
**(*Chenopodium pallidicaule* Aellen) CON MAYOR RENDIMIENTO EN**  
**GRANO: ALTIPLANO – PUNO.**

**TESIS**

**PRESENTADA POR:**

**EVARISTO MAMANI MAMANI**

**PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTORIS SCIENTIAE EN:**  
**CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

**PUNO, PERÚ**

**2013**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO - PUNO**  
**ESCUELA DE POSTGRADO**  
**DOCTORADO EN CIENCIA, TECNOLOGÍA Y MEDIO AMBIENTE**

**CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA**  
**(*Chenopodium pallidicaule* Aellen) CON MAYOR RENDIMIENTO EN**  
**GRANO: ALTIPLANO – PUNO**

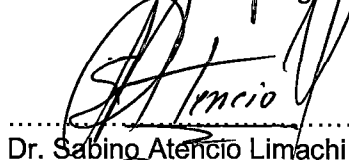
TESIS PRESENTADA POR:  
**EVARISTO MAMANI MAMANI**

SUSTENTADA Y APROBADA ANTE EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE

  
.....  
Dr. Juan Bautista Astorga Neira

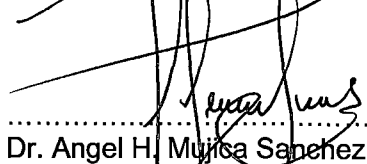
PRIMER MIEMBRO

  
.....  
Dr. Sabino Atencio Limachi

SEGUNDO MIEMBRO

  
.....  
Dr. Eduardo Flores Condori

ASESOR DE TESIS

  
.....  
Dr. Angel H. Mujica Sanchez

PUNO - PERÚ

2013

## **DEDICATORIA**

Esta tesis va dedicada a la memoria de mis padres Domingo y Agripina, por la educación que supieron inculcarme; con mucho amor y cariño a Imelda mi esposa, por su compañía, comprensión, tolerancia y apoyo en todo instante, sin ella, vanos hubiesen sido los esfuerzos desplegados hasta el presente. A los dos tesoros de mi vida, Ewar Alexander y Eber Davis quienes constituyen la razón de mi existencia, a mis hermanos, hermana y sobrinos quienes alentaron desde la distancia mi superación.

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios por concederme la vida, ser mi inspiración y siempre estar a mi lado con piedad.

A la Escuela de Post Grado, Programa de Doctorado de la Universidad Nacional del Altiplano – Puno, por brindarme la oportunidad de proseguir y culminar con mis objetivos propuestos.

Al Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina – Lima, por brindarme todas las facilidades del caso y la asistencia técnica del especialista M.Sc. Joel Flores Ticona.

Al Dr. Ángel M. H. Mujica Sanchez, por su dirección, asesoría, amistad, apoyo durante la ejecución del presente trabajo de investigación, tanto a nivel científico como profesional.

Al Dr. Raúl Blas Sevillano, Profesor del Departamento de Fitotecnia, Facultad de Agronomía – UNALM, por sus valiosas sugerencias y recomendaciones para el presente trabajo.

Al jurado conformado por los doctores: Juan Bautista Astorga Neira, Sabino Atencio Limachi, Eduardo Flores Condori y Ángel M. H. Mujica Sanchez, por su invaluable colaboración, sugerencias y revisión del escrito.

## ÍNDICE

RESUMEN .....	xii
ABSTRACT .....	xiii
INTRODUCCIÓN .....	xiv
CAPÍTULO I .....	1
PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN .....	1
1.1 PROBLEMA .....	1
1.2 OBJETIVOS .....	2
1.2.1 Objetivo General .....	2
1.2.2 Objetivos Específicos .....	2
CAPÍTULO II .....	3
MARCO TEÓRICO .....	3
2.1 ANTECEDENTES .....	3
2.2 MARCO REFERENCIAL .....	5
2.2.1 Características Botánicas de la Cañihua .....	5
2.2.2 Características Agronómicas .....	6
2.2.3 Fases Fenológicas de la Cañihua .....	8
2.2.4 Producción de Grano .....	8
2.2.5 Composición Nutritiva .....	9
2.2.6 Variabilidad Genética Disponible .....	9
2.2.7 Biología Molecular .....	10
2.2.8 Taxonomía Numérica .....	12
2.3 MARCO CONCEPTUAL .....	16
2.3.1 Marcadores Moleculares .....	16

2.3.2	Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism) .....	18
2.3.3	Base Genética.....	18
2.3.4	Obtención de Marcadores AFLP .....	19
CAPÍTULO III .....		22
METODOLOGÍA .....		22
3.1	MATERIAL GENÉTICO.....	22
3.2	DETERMINACIÓN DE DUPLICIDAD EN ACCESIONES DE CAÑIHUA EVALUADAS.....	22
3.2.1	Investigaciones Previas de Campo .....	22
3.2.2	Colección del Material Vegetal y Trabajo de Laboratorio.....	24
3.2.3	Extracción de ADN Genómico.....	25
3.2.4	Análisis de Calidad y Concentración del ADN Aislado.....	27
3.2.5	Obtención de Marcadores AFLP .....	28
3.2.6	Selección de Combinación de Iniciadores AFLP.....	29
3.2.7	Electroforesis del Producto Amplificado AFLP .....	30
3.2.8	Detección de Marcadores AFLP .....	30
3.2.9	Registro y Análisis de Datos AFLP .....	31
3.2.10	Matriz Básica de Datos .....	33
3.2.11	Coeficiente de Similitud y Matriz de Similitud.....	33
3.3	CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y ESTABLECIMIENTO DE GRADO DE ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS ACCESIONES DE CAÑIHUA.....	34
3.3.1.	Análisis de Agrupamientos.....	34
3.3.2.	Dendrograma .....	35



CAPÍTULO IV .....	37
RESULTADOS Y DISCUSION.....	37
4.1 DETERMINACIÓN DE DUPLICIDAD EN ACCESIONES DE CAÑIHUA EVALUADAS .....	37
4.2 CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y ESTABLECIMIENTO DE GRADO DE ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS ACCESIONES DE CAÑIHUA .....	40
CONCLUSIONES .....	51
RECOMENDACIONES .....	53
BIBLIOGRAFÍA .....	54
ANEXOS .....	60
ANEXO 1 .....	66
MATERIALES Y PROCEDIMIENTO.....	66
ANEXO 2 .....	72
PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA ( <i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen) "CAÑIHUA" .....	72
ANEXO 3 .....	77
ANÁLISIS DE CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN .....	77
ANEXO 4 .....	79
POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP).....	79
ANEXO 5 .....	85
PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA .....	85

ANEXO 6 .....	89
DETECCIÓN DE MARCADORES AFLP CON TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA (PROMEGA CORPORATION, 2000; CIP, 2000).....	89
ANEXO 7 .....	91
PREPARACIÓN DE OTROS REACTIVOS UTILIZADOS .....	91

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>CUADRO 1</b> .....	23
RENDIMIENTO EN GRANO DE 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA ( <i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen) SELECCIONADAS DE 100 ACCESIONES PROCEDENTES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CIP CAMACANI EN Kg/ha - CAMPAÑAS AGRICOLAS 2008-2009, 2009-2010 Y 2011-2012 .....	23
<b>CUADRO 2</b> .....	33
COMPARACIÓN DE UN CARÁCTER DE DOBLE ESTADO DE DOS OTUS j Y k. ....	33
<b>CUADRO 3</b> .....	38
COMBINACIÓN DE INICIADORES AFLP EMPLEADOS Y NÚMERO DE MARCADORES ENCONTRADOS EN 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CIP CAMACANI-PUNO. PRIMER SEMESTRE DEL 2013 .....	38

## ANEXOS

<b>CUADRO 4</b> .....	61
RELACIÓN DE ACCESIONES DE "CAÑIHUA" ( <i>Chenopodium pallidicaule</i> Aellen) EVALUADAS – PRIMER SEMESTRE 2013 .....	61
<b>CUADRO 5</b> .....	63
MATRIZ BÁSICA DE DATOS DE LAS 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA – PRIMER SEMESTRE 2013.....	63
<b>CUADRO 6</b> .....	65
MATRIZ DE COEFICIENTES DE SIMILITUD DE LAS 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA – PRIMER SEMESTRE 2013 .....	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> ADN Extraído de las 26 accesiones de cañihua. (Primer Semestre 2013).....	26
<b>Figura 2.</b> Calidad de ADN obtenido en los ensayos de extracción. (Primer Semestre 2013).....	28
<b>Figura 3.</b> Perfil de amplificación AFLP utilizando la combinación de iniciadores <i>EcoRI</i> ATG/ <i>MseI</i> CT (Primer Semestre 2013) .....	32
<b>Figura 4.</b> Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua con tres marcadores AFLP a un coeficiente de similitud de 0.4 (Primer semestre 2013). .....	41
<b>Figura 5.</b> Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua con tres marcadores AFLP a un coeficiente de similitud de 0.65 (Primer semestre 2013). .....	45
<b>Figura 6.</b> Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua – Comparativo Campañas Agrícolas (Primer semestre 2013). .....	48

## ANEXOS

<b>Figura 7.</b> Extracción de ADN modificado para ( <i>Chenopodium palidicaule</i> Aellen) “Cañihua” .....	76
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## ABREVIATURAS

- ADN : ácido desoxirribonucleico
- AFLP : Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados
- ARN : ácido ribonucleico
- BSA : albúmina de suero bovino
- CTAB : bromuro de hexadeciltrimetil amonio
- H<sub>2</sub>O : agua destilada
- EDTA : ácido etilen diamino-tetra acético
- EtBr : bromuro de etidio
- g : gramo
- ISSR : Secuencias entre Repeticiones Simples
- Kb : kilobases
- mA : miliamperios
- ml : mililitros
- ng : nanogramo =  $10^{-9}$  gramos
- nm : nanómetros =  $10^{-6}$  metros
- PCR : Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PM : peso molecular
- RAPD : Polimorfismo de ADN Amplificado al Azar
- RFLP : Polimorfismo de Longitud de Fragmentos de Restricción
- seg : segundo
- SSR : Repeticiones Simples Repetidas / microsatélites
- TBE : tris-borato EDTA
- Tris : tris (hidroximetil) aminometano
- U : unidad de enzima

UV : ultravioleta

V : voltios

°C : grados Centígrados

μg : microgramo =  $10^{-6}$  gramos

μl : microlitro =  $10^{-6}$  litros

## RESUMEN

En la investigación, se evaluó la variabilidad genética de 26 accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), procedentes del Banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Producción Camacani-Puno, en el Laboratorio de Biología Molecular del instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima, en el transcurso del primer semestre del año en curso 2013; el objetivo de este estudio fue el de caracterizar a nivel molecular y construir el dendrograma para establecer el grado de asociación de distancias genéticas entre las accesiones de cañihua y detectar la presencia o no posibles duplicados. Para realizar el estudio de caracterización molecular, se utilizaron 16 combinaciones de marcadores moleculares - AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados) de los cuales con el uso de solo 3 marcadores EcoRI ATG/MseI CTG, EcoRI AAG/MseI AGC y EcoRI ACT/MseI AGG, se lograron obtener bandas polimórficas, los que fueron estudiadas mediante el análisis de agrupamiento, media aritmética no ponderada – UPGMA, y para construir el dendrograma se utilizó matriz básica de datos y el coeficiente de similitud entre las accesiones de cañihua; para tal efecto, primero se procedió con la extracción de ADN por accesión, utilizando el protocolo de extracción, método CTAB (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio), los que fueron cuantificados por corrida electroforética en geles de agarosa y luego se realizó la electroforesis de los productos amplificados de ADN en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%. Como resultado, se obtuvieron 188 fragmentos amplificados de ácido desoxirribonucleico (ADN), de las cuales 68 fueron informativos con un promedio de 22.6 bandas polimórficas que fueron logrados con la combinación de tres iniciadores de AFLP y el dendrograma a través del grafico ha demostrado la usencia de duplicados en accesiones de cañihua.

Palabras Clave: AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), dendrograma, electroforesis, marcadores moleculares, variabilidad genética.

## ABSTRACT

In the research the genetic variability of 26 cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) accessions were evaluated, all of them came from the Germplasm Bank from the Research And Production Center in Camacani – Puno, in the Molecular Biology Laboratory in the Biotechnology Institute at the Universidad Nacional Agraria La Molina Lima – Peru; during the first year semester in 2013; this research objective was to characterize at molecular level and build a dendrogram to establish the genetic distances association among cañihua accessions and to detect or not the presence of possible duplicates. To perform this molecular characterization study, 16 combinations were used as molecular markers – AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) using only 3 of the markers: EcoRI ATG/MseI CTG, EcoRI AAG/MseI AGC and EcoRI ACT/MseI AGG, from which we got polymorphic bands , which were studied by cluster analysis , Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean – UPGMA, and to build the dendrogram, a basic data matrix and the similarity coefficient among cañihua accessions were used; to do that the DNA extraction for each accessions was done using the extraction protocol, CTAB method (hexadecyltrimethylammonium bromide) which were quantified by electrophoresis in agarose gel and then electrophoresis of the DNA amplified in polyacrylamide non-natural gels at 6%. As a result 188 amplified fragments of deoxyribonucleic acid DNA were got; from which 68 ones were informative with an average of 22.6 polymorphic bands which were the result of three AFLP indicators and the dendrogram show the absence of duplicates in the cañihua accessions that were part this research.

Key Words: AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), dendrogram, electrophoresis, genetic variability, molecular markers.



## INTRODUCCIÓN

Por sus características físico geográficas particulares, el altiplano peruano se constituye como una región megadiversa, con posibilidades de producción y generación de riqueza genética para garantizar la seguridad alimentaria, por esto es reconocida como centro de origen de plantas nativas domesticadas como la papa, oca, olluco, mashua, quinua y cañihua, que son importantes para la conservación de recursos fitogenéticos y el mantenimiento de la biodiversidad bajo una perspectiva sostenible.

La conservación de la diversidad genética de muchas especies andinas, particularmente la cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), atraviesa actualmente por una situación crítica dentro del espectro de agricultura tradicional, por falta de financiamiento para su mantenimiento y por el desplazamiento continuo de su cultivo por variedades comerciales en expansión.

La cañihua es una planta andina cultivada desde tiempos preincaicos, adaptada a las altitudes, con buenos rendimientos en grano cuando se la conduce adecuadamente. Actualmente es considerada como la segunda especie de importancia económica después de la quinua, las semillas tiene un contenido de proteína de (15-19%), carbohidratos (60%) y grasa (8%); es más, los granos presentan un balance óptimo de aminoácidos como la lisina, isoleucina y el triptófano y es antioxidante.

En el Banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Producción Camacani (CIP. C) de la UNA Puno, existen 341 accesiones procedentes de colecciones que datan de más de 35 años que no cuenta con estudios relativos a su diversidad genética, por consiguiente es prioritario su estudio. La caracterización molecular es un primer paso para conocer las variaciones genéticas, relacionados

al ácido desoxirribonucleico (ADN), que presenta cada una de las accesiones de esta especie, que va a permitir una mejor utilización, manejo técnico de cultivo, y el proceso de mejoramiento.

Considerando la importancia de la cultivo de la cañihua y precedentes, se procedió con el análisis de caracterización a nivel molecular de 26 accesiones de cañihua, en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina – Lima, utilizando marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), tecnología apropiada para caracterizar la diversidad genética de cañihua y descartar la duplicidad entre accesiones mediante el uso del dendrograma.

## CAPÍTULO I

### PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN

#### 1.1 PROBLEMA

La cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), tradicionalmente fue considerada hasta el pasado reciente como un cultivo sin mayor importancia debido al desconocimiento de sus grandes bondades alimenticias, retoma su importancia original, reconociendo que la naturaleza había provisto a los pobladores del altiplano un alimento adecuado y confortante como para resistir a las condiciones climáticas duras impuestas por la altitud del altiplano y de los andes, traducidos en una baja presión atmosférica, frigidez, escasez de oxígeno e incluso atribuyendo a este cultivo cualidades y propiedades curativas para contrarrestar ciertas enfermedades infecciosas y para recuperar a los agotados físicamente por ciertas enfermedades.

La cañihua o cañiwa, es una de las especies de los cultivos del altiplano andino peruano, menos estudiado en cuanto a la caracterización fenotípica y genotípica; razón por la cual se viene conservando solo como accesiones o colecciones; aún más, no ha tenido mayor difusión fuera de las fronteras del altiplano andino Perú y Bolivia (Chervin 1908, Mamani y Callohuanca 2006, Vargas 1938).

En la actualidad no está identificado en las accesiones de cañihua los genes resistentes a los factores bióticos y abióticos; muchas de ellas están en vías de extinción en sus nichos ecológicos, porque no existe medios de conservación adecuada In-situ y Ex-situ, excepto un pequeño Banco de Germoplasma con que se cuenta en el Centro de Investigación Producción Camacani, sin financiamiento alguno; de continuar así el problema, traerá consigo una gran pérdida de cultivares de cañihua con características nutracéuticas.

Actualmente, el problema principal del cultivo de cañihua es el bajo rendimiento en grano con un promedio de 700 Kg/ ha., limitada de tecnología de mejoramiento adecuado para proponer al productor y que éste puede adoptar, poco o nada de industrialización además de la apertura de un mercado para que la población pueda consumir bajo diferentes formas procesadas, falta de financiamiento, motivación y organización de los productores.

## **1.2 OBJETIVOS**

### **1.2.1 Objetivo General**

Realizar estudios de caracterización molecular de 26 accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) con mayores rendimientos en grano

### **1.2.2 Objetivos Específicos**

- Descartar la presencia de duplicados en las accesiones evaluadas en la presente investigación.
- Construir los dendrogramas y establecer el grado de asociación de distancias genéticas entre las accesiones de cañihua.

## CAPÍTULO II

### MARCO TEÓRICO

#### 2.1 ANTECEDENTES

Los antecedentes con respecto a la caracterización molecular para la presente investigación son escasos y dispersas para la región y el país, sin embargo es menester mencionar lo siguiente:

Vargas *et. al* (2010), manifiestan que, una colección de 43 genotipos silvestres y cultivares de cañahua, procedentes de Bolivia-Perú, fueron evaluados usando 192 marcadores microsatélites para indagar el polimorfismo, y en esta prueba lograron obtener 161 (85%) de productos simples de amplificación, en base a la tecnología de biología molecular PCR; en conclusión de cualquier forma, solo 36 fueron bandas polimórficas informativos, en las cuales la amplificación selectiva con dinucleótidos adenina y timina (AT), generaron mayor polimorfismo en los cultivares de cañahua.

Megar (2012), en su estudio de análisis molecular de 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.), utilizando marcadores moleculares AFLP para evaluar el grado de diversidad, probó 23 combinaciones de primers AFLP, de los cuales 7 primers generaron mayor polimorfismo, lográndose obtener 139 bandas polimórficas; los primers de AFLP que generaron el mayor número de bandas polimórficas fueron

E32M35 con 14 bandas polimórficas, E13M59 con 22, E32M59 con 20, E38M59 con 23, E12M41 con 20, E12M35 con 21 y E13M35 con 19 bandas polimórficas respectivamente.

Domínguez (2002), reporta que como resultado del estudio de Caracterización Molecular de 10 accesiones de Sangre de Grado (*Groton sp*) utilizando AFLP, obtuvo 4 combinaciones de iniciadores con los siguientes resultados: E-ACC/M-CAA 22 bandas polimórficas, E-AGG/M-CAG 29 bandas polimórficas, E-ACT/M-CTT 27 bandas polimórficas y E-AGG/M-CAT 21 bandas polimórficas, siendo el resultado mejor o igual comparado con otros métodos de marcadores moleculares.

Nagatomy (2011), en un estudio de diferenciación de 48 accesiones de oca (*Oxalis tuberosa* Molina), usando marcadores AFLP, logró obtener 85 fragmentos amplificados en su mayoría polimórficas con 57.6% y en promedio se produjeron 16 bandas polimórficas por combinación de iniciador. Las combinaciones con mayor número de bandas polimórficas generadas fueron: E-ACT/M-CTC y E-ACA/M-CTC, con un porcentaje de polimorfismo de 64.7% y 58.6% respectivamente.

Alonso (2003). Para establecer la factibilidad del uso de marcadores moleculares RAPD (Polimorfismo en el ADN amplificado al azar), en la caracterización, determinación de duplicados y la afinidad entre clones, se realizó un estudio preliminar con 11 oligonucleótidos y 8 entradas de pastomiel (*Paspalum dilatatum*) de la colección elegida al azar dentro del citotipo. Las relaciones entre clones se establecieron mediante un análisis de agrupamiento en base al coeficiente de similitud de Jaccard, se obtuvieron con el arcador 123 fragmentos amplificados

de los cuales 90 fueron bandas polimórficas, los que posibilitaron la diferenciación completa de los 8 clones al igual que los marcadores AFLP.

Poggio (2003). Para analizar las diferencias genéticas existentes entre líneas selectas de Agropiro criollo (*Elymus breviaristatus ssp*) y a sus híbridos artificiales, provenientes del Programa de Mejoramiento Genético UNL-UBA. Se optimizó la técnica de AFLP, utilizando 5 combinaciones de cebadores. Se construyó una matriz básica de datos (14 OTUs x 369 loci), calculándose las distancias genéticas mediante los coeficientes de Jaccard y de Nei and Li. Los análisis de agrupamiento se realizaron por UPGMA y Neighborjoining, obteniéndose los dendrogramas correspondientes, se halló alta similitud entre líneas selectas (0.977-0.988), no obstante del total de bandas generadas, el 40% se consideraron polimórficas y esto hace que exista una diferenciación genética en líneas elegidas. Los resultados indican que el método AFLP es adecuado para analizar diferencias genéticas en los tejidos de especies de plantas.

## **2.2 MARCO REFERENCIAL**

### **2.2.1 Características Botánicas de la Cañihua**

Considerando el sistema de clasificación de Chervin (1908), la cañihua corresponde a la siguiente clasificación taxonómica: Reino Vegetal, Subreino Fanerógamas, División Angiospermas, Clase Dicotiledóneas, Subclase Achyclamydias, Orden Centrospermales, Familia *Chenopodiaceae*, Genero *Chenopodium*, Especie (*Chenopodium palledicaule* Aellen); esta especie del genero *Chenopodiaceas* fue identificada en 1929 por el Botánico Suizo Paul Aellen. La cañihua es una planta herbácea, erguida, terófito, cuya altura varía entre 20 a 70 cm con ramificaciones que nacen desde la base del tallo y son

numerosas en los de tipo lasta y poco en las saihuas. La raíz es pivotante, axoforma y estriada, relativamente profunda que llegan alcanzar de 15 a 30 cm de profundidad con numerosas raicillas laterales (León 1964, Tapia, 1979 y Velasco 1970).

Por su parte Paredes (1963) y Calle (1979), describieron las características aéreas de la planta como son el tallo y las hojas; el tallo en un corte transversal es redondo, la coloración del tallo y el follaje varían entre amarillo, verde, anaranjado, rojo y púrpura; las hojas son alternas presentan peciolo cortos y finos, las láminas son engrosadas de forma romboidal cubiertas de vesículas blancas o rosadas, miden de 1 a 3 cm de largo, en la parte superior se dividen en tres lóbulos y presentan tres nervaduras bien marcadas en la cara inferior.

Las inflorescencias se ubican en las axilas o terminales, son inconspicuas y están totalmente cubiertas por el follaje. Las flores están agrupadas formando espigas, (Vargas, 1938); tienen flores hermafroditas o estaminadas muy pequeñas de 1 a 2 mm de diámetro, sésiles. El perigonio está compuesto de 5 partes, (Hunziker, 1952). El fruto es utrículo a aquenio, el color de la semilla varía de castaño claro a negro (Velasco, 1970).

### **2.2.2 Características Agronómicas**

La cañihua es una planta originaria de los andes del sur del Perú y norte de Bolivia, fue domesticada por los pobladores de la cultura Tiahuanaco asentados en la meseta del Collao. No se han encontrado vestigios arqueológicos relacionados con esta planta, y la deshiscencia que aun presentan los granos en su etapa de maduración, implica que su domesticación no está completa, (Mujica, 1998); la cañihua del altiplano, posee amplia capacidad de adaptación de



fotoperiodismo indeterminado con pigmentación variada, sin embargo los fotoperiodos cortos favorecen la temprana floración y maduración en altitudes desde los 3800 a 4300 msnm (Mamani y Callohuanca, 2006).

Referente al estudio citogenético de la cañihua, son pocos los trabajos realizados para el mejoramiento genético, Gandarillas (1968), determinó el número cromosómico de la cañihua, estableciéndose que la especie tiene 18 cromosomas en células somáticas ( $2n=2x=18$ ) y su número básico fue de  $x=9$ ; de esta manera la cañihua es diploide. Con aplicaciones de 3% de colchisina en los cotiledones, obtuvieron plantas autotetraploides con ( $2n=4x=36$ ) cromosomas (Gandarillas y Gutiérrez, 1979).

Con respecto al cultivo de la cañihua, Vallenas y Carpio (1974), recomiendan realizar la siembra en los meses de setiembre a octubre en los kallpares del cultivo de la papa, puesto que estos suelos se encuentran mullidos, sin embargo se debe pasar un rastra cruzada antes de sembrar hasta una profundidad de 20 cm. La siembra se debe efectuar preferentemente en surcos para facilitar las labores culturales y la distancia varía de 30 a 40 cm según el tipo de cañihua saihua y lasta, la densidad de siembra fluctúa de 8 a 10 kg/ha y el periodo vegetativo de la cañihua es de 4 a 5 meses, dependiendo de la precocidad de las mismas y las condiciones de humedad; por lo general en periodos secos maduran más rápidamente y la cosecha se realiza entre los meses de marzo y abril, ya que no todas las accesiones de cañihua maduran al mismo tiempo (Mamani y Callohuanca, 2006).

### **2.2.3 Fases Fenológicas de la Cañihua**

INIA (1994), señala que los vegetales pasan por varias etapas en su periodo de desarrollo, produciendo cambios en tamaño, forma y número; la emergencia, dos hojas verdaderas, ramificación, formación de inflorescencia, floración, grano lechoso, grano pastoso y madurez fisiológica son las fases fenológicas más resaltantes de la cañihua, la madurez fisiológica en la cañihua, se da cuando los granos acumulan un máximo de materia seca y un máximo tamaño de grano.

### **2.2.4 Producción de Grano**

Mamani y Callohuanca (2006), hacen conocer que el tamaño pequeño de la semilla de cañihua de 1 a 1.5 mm de diámetro dificulta la cosecha y los rendimientos a la intemperie resultan ser bajos; (MINAG-DRA. Puno, 2002), reporta un rendimiento promedio de 675 kg/ha como resultado de diez campañas agrícolas y esto hace que el cultivo de la cañihua no resalte comparado con la quinua. Sin embargo Mamani y Callohuanca (2006), en sus trabajos de investigación efectuados con relación a la producción y rendimiento en grano en 100 accesiones de cañihua, procedentes del Banco de Germoplasma de la UNA – Puno, sembradas en la campaña agrícola 2004-2005, lograron obtener 21 accesiones de cañihua con mayores rendimientos que son los siguientes: 146 (1305 kg/ha), 315 (1278 kg/ha), 215 (1198 kg/ha), 231 (1099 kg/ha), 246 (1099 kg/ha), 144 (1087 kg/ha), 46 (1060 kg/ha), 18 (1035 kg/ha), 194 (1008 kg/ha), 2 (1000 kg/ha), 179 (991 kg/ha), 27 (962 kg/ha), 124 (929 kg/ha), 37 (912 kg/ha), 134 (899 kg/ha), 106 (893 kg/ha), 26 (885 kg/ha), 14 (846 kg/ha), 51 (824 kg/ha), 3 (817 kg/ha) y 160 (802 kg/ha) de grano; la variación de la producción y el rendimiento en grano, se puede atribuir al poder germinativo, el medio ambiente,

características genéticas y al genoma total de cada uno de las accesiones en estudio.

### **2.2.5 Composición Nutritiva**

La semilla cañihua o cañahua históricamente cultivada en el altiplano del Perú y Bolivia, tiene un contenido de proteína de (15-19%), carbohidratos (60%) y grasa (8%), además tiene un balance óptimo de aminoácidos como la lisina, isoleucina y el triptófano, adecuada para dietas escasas en carne y adecuada para el consumo de personas alérgicas al gluten, previene males cardio vasculares y en parte viene a constituir la dieta de los astronautas por su característica antioxidante desde 1985, es decir, el grano de esta especie sin duda es nutraceutico (Verástegui, 2009); por otra parte Tapia (1979), indica que la cañihua se debe consumir en forma de cañihuaco, que es el grano tostado y molido, el producto es muy aromático y agradable, es eficaz energizante por su buen contenido enzimático, es efectivo contra el mal de altura, contribuye a revitalizar nuestro organismo.

### **2.2.6 Variabilidad Genética Disponible**

La variabilidad genética está representada en los Bancos de Germoplasma *Ex situ* e *In situ*, los primeros a cargo de las instituciones de investigación y universidades. En el Perú, podemos mencionar los Bancos de Germoplasma de la Estación Experimental (EE) Camacani de la Universidad Nacional del Altiplano; EE Illpa del INIA en Puno; el Banco de Germoplasma del CICA de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cusco; EE Andenes del INIA, Cusco; EE Canan del INIA, Ayacucho; EE Allpachaca de la Universidad Nacional San Cristóbal de

Huamanga; EE Santa Ana del INIA, Huancayo; EE el Mantaro de la Universidad Nacional del Centro; EE Baños del Inca del INIA, Cajamarca; el Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional de Cajamarca.; el Banco de Germoplasma de la Universidad Nacional Agraria en Lima. En Bolivia en el PROINPA, en Ecuador en la EE Santa Catalina, en Colombia en la Universidad Nacional de Colombia, en Chile en el INIA de La Serena, en Argentina en la Universidad Arturo Prat, Universidad de Buenos Aires y en la Universidad de Jujuy, (Mujica y Jacobsen, 1998).

## **2.2.7 Biología Molecular**

### **Biología Molecular de los Genes**

Según Etienne (1999), la biología molecular consiste en el estudio de la estructura de los genes, de su expresión y del control de su expresión; por tanto está condicionada a trabajar esencialmente con las moléculas de ácido desoxirribonucleico (DNA) y del ácido ribonucleico mensajero (mRNA). En los laboratorios de investigación se realizan verdaderas construcciones de DNA, o generación del ADN recombinante, de ahí nace el nombre de Ingeniería Genética propuesto por los biólogos para determinar nuevo conjunto de biotecnologías. (Watson, 2006).

### **Ácidos Nucléicos**

Son sustancias formadas por numerosos nucleótidos que, fueron aislados inicialmente a partir del núcleo-celular y posteriormente en el citoplasma de las células, y existen dos tipos de ácidos nucleicos: el ácido desoxirribonucleico (DNA) localizado en el núcleo de la célula, como en el caso de los organismos

eucariotas, y los ácidos ribonucleicos (RNA) se encuentran localizados en el citoplasma de las células; ambos ácidos cumplen la función de síntesis de proteínas y compuestos celulares y son responsables de las actividades biológicas (Etienne, 1999).

### **Estructura y Características del DNA**

Etienne (1999), indica que las estructuras del DNA, son moléculas muy largas formadas por la repetición de subunidades denominadas nucleótidos y un nucleótido está compuesto por un azúcar: la desoxirribosa, cuatro bases nitrogenadas la citosina (C), timina (T), adenina (A), guanina (G) y un grupo fosfato. Así mismo una molécula de DNA, es habitualmente formado por dos cadenas denominadas 2 hebras de nucleótidos, mientras que una molécula de RNA, solo presenta una hebra; en cambio Watson y Losick (2006), en forma similar propusieron el modelo de la doble hélice de ADN para representar la estructura tridimensional del polímero, con tres propiedades esenciales como son: las anteparalelas en hebras de nucleótidos en direcciones opuestas; complementariedad en donde, enfrente del (A) se encuentra (T) y en frente de (C) se encuentra (G) y es necesario no olvidar que esto se trata de nucleótidos en donde las letras significan en realidad: C: "nucleótido con citosina"; T: "nucleótido con timina"; A: "nucleótido con adenina"; G: "nucleótido con guanina"; y Helicoidales, es decir que las dos cadenas de DNA presentan en el espacio una configuración helicoidal.

## **2.2.8 Taxonomía Numérica**

### **Generalidades**

La taxonomía numérica es una herramienta en la clasificación de individuos y es definida como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas unidades en taxones, basándose en el estado de sus caracteres Sokal y Sneath (1963). Por otra parte, Crisci y López (1983) reportan que con los datos obtenidos a través de marcadores moleculares, se pueden analizar utilizando técnicas de agrupamiento, con el fin de lograr la agrupación y determinación del grado de parentesco, ya que esta herramienta, brinda repetitividad y objetividad a fin de que en estudios separados o independientes se pueda lograr interpretaciones similares con respecto a la semejanza de dos o más organismos evaluados con un mismo ajuste de caracteres descartando la subjetividad.

Para la clasificación y el análisis de datos Sokal y Sneath (1963), Crisci y López (1983), sugieren seguir algunos pasos: elección de las unidades o Unidades Taxonómicas Operativas (OTUs), elección de caracteres que puedan ser morfológicos, fisiológicos, químicos, etológicos, geográficos o genéticos; construcción de una matriz básica de datos (MBD) es decir los datos obtenidos se presentan en forma de cuadros; obtención de un coeficiente de similitud que son determinados para cada par de OTUs dependiendo del tipo de carácter analizado; construcción de una matriz de similitud, ósea con los valores de coeficiente de similitud calculados se construye una matriz de OTU por OTU y luego la formación de grupos.

El tipo de dato o estado de carácter, según Crisci y López (1983), pueden ser:

- Datos doble estado, que representa presencia/ausencia, llamados también binarios y datos excluyentes.
- Datos multivariados que pueden ser cualitativos sin o con secuencia lógica y cuantitativos continuos o discontinuos.

Sokal y Sneath (1963), indicaron que el número de caracteres a evaluar es arbitrario, no existe un número estándar o fórmula para calcular el número de caracteres que se deberían emplear; sin embargo existen algunas consideraciones generales que podrían ser útiles en este punto; mientras mayor sea el número de caracteres evaluados mayor será la información recolectada ya que estos caracteres tomados al azar y sin sesgo estarán representando una muestra al azar del genoma. De la misma forma, al comparar los caracteres de dos OTUs de obtener su grado de similitud se tendrá en cuenta cuántos de estos caracteres son compartidos entre dos OTUs con relación al total de caracteres, y esta similitud se hará cada vez más estable, conforme el número de caracteres evaluados aumente.

La taxonomía numérica según Crisci y López (1983), exige que todos los datos deben ser expresados en forma cuantitativa, de modo que sean computables; como no todos los caracteres se pueden expresar de este modo, algunos deben ser sometidos a una transformación para poder trabajar con ellos por ejemplo con datos de origen morfológico; en cambio cuando se trabaja con datos doble estado no es necesario la transformación, porque ya indican presencia/ausencia de un carácter. Así mismo Crisci y López (1983), señalan que los marcadores moleculares, son un ejemplo de este tipo, es decir en este caso se trata de la presencia /ausencia de un determinado marcador molecular como 1 la presencia y 0 la ausencia respectivamente.

### **Matriz Básica de Datos**

González y Pita (2001), hacen conocer que la matriz básica de datos (MBD) es una matriz rectangular, colocado en filas las OTU y en columnas los caracteres analizados; por tanto la matriz recoge el valor de cada carácter en cada una de las OTU; en el caso de que exista variabilidad intra-OTU, se tomará como valor representativo el mayor carácter en cada OTU.

### **Coefficiente y Matriz de Similitud para la Conformación de la Estructura Taxonómica**

Crisci y Lopez (1983), confirman que los coeficientes de similitud cuantifican el parecido o similitud entre OTUs, siendo la matriz de similitud la representación de estos resultados; ambos coeficientes, miden las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos OTUs y se aplican principalmente a datos doble estado. Por otra parte la elección del coeficiente de similitud depende de la matriz básica de datos, generalmente se usa el coeficiente de asociación, para los datos doble estado. Entre los coeficientes de asociación utilizados para datos binarios es conveniente utilizar coeficiente de concordancia simple (simple matching: SMC); de la misma manera Crisci y López (1983), hacen conocer que uno de los métodos de agrupamiento más empleado, sobre todo en el análisis de diversidad genética con marcadores moleculares es conocido como UPGMA (*Unweigthed Pair-Group Method Usin Arithmetic Averages*) o media aritmética no ponderada. El algoritmo UPGMA es un método de agrupamiento conocida como jerárquico, aglomerativo, secuencial y exclusivo. Parte de las "n" OTUs separados, teniendo "n" grupos inicialmente y va juntando las OTUs en grupos



secuencialmente. Las OTU más similares son agrupadas primero y estos grupos iniciales son luego juntados de acuerdo a su similitud. Los grupos que se originan presentan rangos y además, las OTUs miembro de un grupo, no puede pertenecer a otro grupo que se halle en un mismo nivel.

Por su parte Sevilla y Holle (2004), señalan que, la elección del coeficiente de similitud depende del tipo de datos que constituyan la matriz básica de datos MBD, generalmente los coeficientes de asociación y de distancia se utilizan para los datos doble estado, el coeficientes de similitud o Simple Matching (SM), que se muestra en la siguiente expresión:  $S_{SM} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$ , simplemente es la proporción de caracteres que comparten las dos muestras. Por otra parte Winzer *et. al* (2004), mencionan que dos muestras, son más parecidas cuanto más “unos” compartan y la coincidencia de “ceros” no aporta a la similitud, es decir, no considera dobles ausencias para no sobre estimar la similitud a partir de características que no están presentes en ninguno de los dos individuos. En tanto que, para Sokal *et. al* (1963), dos muestras deberán considerarse más asociadas tanto cuando comparten unos (1,1) como ceros (0,0), ya que la codificación que se les asigna es indistinta.

### **Representación Gráfica de Análisis de Agrupamientos**

Rolfh (2000), reporta que existe métodos para el cálculo de similitud, entre la OTU candidato a incorporarse en el grupo o núcleo al que se incorpora, el más utilizado es el UPGMA; la estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud, con la técnica de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente utilizando un dendrograma, el cual es un diagrama arborescente que muestra la relación del grado de similitud entre dos OTUs o grupos de OTUs y según Crisci y

López (1983), señalan también que, la estructura taxonómica, obtenida a partir de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente de varias formas, pero la más recomendada es el dendrograma, que es un diagrama arborescente bidimensional que muestra las relaciones en grado de similitud entre dos o más OTUs. Los valores de similitud se expresan en una escala que puede encontrarse en la parte superior o inferior. Así mismo Crisci y López (1983), indican que un dendrograma incluye a dos tipos de gráficos: fenogramas y cladogramas; el primero representa relaciones fenéticas y el segundo representa a las ramificaciones relacionadas a caracteres filogenéticas entre las OTUs.

## **2.3 MARCO CONCEPTUAL**

### **2.3.1 Marcadores Moleculares**

La definición de la estructura molecular del ácido desoxirribonucleico (ADN), por parte de Watson y Crick en los años 50, abrió nuevas alternativas científicas para el conocimiento y mejor aprovechamiento de las plantas, animales y microorganismos, contribuyendo de una gran manera a la revolución biotecnológica (Philips *et. al*, 1995). Por otra parte según Gupta *et. al* (2004), un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia), cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida; el autor en mención también indica que, en la actualidad, se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo que permiten analizar la totalidad de la información genética (genoma) de un organismo. Cada molécula de ácido

desoxirribonucleico consiste de una doble hélice formada a partir de las hebras complementarias de nucleótidos, emparejadas mediante conexiones de hidrogeno entre los pares de bases G-C y A-T (Alberts *et. al*, 1994).

El contenido genético del ADN detectado mediante el uso de marcadores moleculares, se ha convertido en una herramienta para identificar las características que están relacionadas con la resistencia a enfermedades, producción, calidad, etc.; su uso eficiente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica, así como también para la caracterización e identificación de genotipos (Philips y Mora, 1995).

Según Ferreira y Grattapaglia (1998), los marcadores moleculares morfológicos contribuyeron significativamente al desarrollo teórico de análisis de ligamiento y la construcción de las primeras versiones de mapas genéticos. Por su parte según Montaldo y Meza-Herrera (1998), señalan que la revolución en este plano se inició con el descubrimiento y utilización de los marcadores isoenzimáticos, los cuales se definen como un grupo de múltiples formas moleculares de una misma enzima presentes en una especie, como resultado de la presencia de más de un gen codificado para cada una de las enzimas.

Becerra y Paredes (2000), manifiestan que, con la aparición de las técnicas modernas de biología molecular se probaron diversos métodos de detección de polimorfismo genético de ADN. Inicialmente la utilización de enzimas de restricción permitió el análisis del Polimorfismo en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP), luego se desarrolló el proceso de amplificación en cadena utilizando un ADN polimerasa o técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa

(PCR) y de estas dos técnicas se ha derivado Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), y otras.

### **2.3.2 Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP – Amplified Fragment Length Polymorphism)**

Esta técnica combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismo usando PCR, Ferreira y Grattapaglia (1998). Este marcador molecular, tiene varias aplicaciones en diversos estudios de genética: evaluación de filogenia y diversidad, Paul *et. al* (1997) y Kim *et. al* (2002), orígenes geográficos en ciertos genotipos así como identificación de banco de genes (Zhang *et. al*, 2000; Tang, 2003 y Paul *et. al*, 1997), en el mejoramiento y reproducción ya que cubren todo el genoma, se ha demostrado que se heredan de forma mendeliana (Akerman *et. al*, 1996).

### **2.3.3 Base Genética**

El polimorfismo detectado en los fragmentos de ADN por AFLP, resultan de mutaciones de punto, inversiones, deleciones o inserciones. Dichas alteraciones, conllevan a la pérdida o creación de un sitio de restricción o a una alteración de la secuencia reconocida por los nucleótidos arbitrarios de los extremos 3' de los iniciadores. Los marcadores AFLP son dominantes, no permitiendo la detección de heterocigotos, lo que no permite distinguir a los diferentes alelos de un locus (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

#### 2.3.4 Obtención de Marcadores AFLP

El análisis AFLP consta básicamente de 4 etapas según Ferreira y Grattapaglia (1998):

- a) Digestión del ADN genómico total con enzimas de restricción: consiste en la segregación de secuencia de ADN en el genoma total con enzimas de corte y se realiza con dos enzimas, una de corte raro que reconoce entre 6 a 8 pares de bases o una secuencia rara de base, las más comúnmente usadas son EcoRI o PstI, y otra de corte frecuente que reconocen cuatro pares de bases, y entre ellas se encuentran MseI o TaqI, con dicha digestión secuencial se genera tres clases de fragmentos que difieren en las extremidades.
- b) Unión de los adaptadores específicos: los adaptadores poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción. Estos poseen entre 15 a 25 pares de bases cuyas secuencias son diferentes en cada uno de ellos.
- c) Amplificación por PCR: se realizan dos amplificaciones, ya que el tamaño de fragmentos o marcadores obtenidos podría ser excesivamente grande como para obtener una buena definición de cada uno de los fragmentos individuales, inclusive en geles de alta resolución. En la primera amplificación o pre-selectiva, son seleccionados los fragmentos del ADN digeridos y ligados, que serán amplificados, donde los iniciadores utilizados contienen un solo nucleótido arbitrario adicional, con lo que solamente uno de los cuatro pares de bases posibles interviene en la producción de fragmentos amplificados. En la segunda amplificación o amplificación selectiva de los fragmentos de ADN pre-amplificados, los iniciadores utilizados poseen otros dos nucleótidos arbitrarios adicionales, con lo que la amplificación se hace más selectiva.

d) Electroforesis: es la separación de los productos amplificados en geles de poliacrilamida y la detección de bandas empleando radioisótopos, fluorescencia o tinción con Nitrato de plata. Para radioisótopos y fluorescencia, es necesario en la amplificación selectiva, que el iniciador AFLP dirigido contra el adaptador para el extremo cortado por la enzima de corte raro, debe estar marcada en su extremo 5', ya sea con un radioisótopo o con un tinte fluorescente. Al emplearse la tinción con plata, los fragmentos de ADN al reaccionar con este metal, forman un complejo de color fácilmente identificable.

En la comparación con distintos marcadores moleculares para evaluar diversidad genética en accesiones de cebada (*Hordeum vulgare*), se reportó que el empleo de marcadores AFLP brindó mayor información que al usar marcadores RAPD, RFLP o ISSR (Russel *et. al*, 1997).

Ferreira y Grattapaglia (1998), hacer conocer que, en un estudio de relación genética de dos especies de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen), Sayhua y Lasta, aseguran estar muy cercanos el uno con el otro, dado los perfiles de bandas polimórficas en el ADN amplificado al aza (RAPD), sin embargo marcadores específicos para cada variedad fueron encontrados. Por otra parte estas especies de *Chenopodium pallidicaule* exponen altos niveles de diferencia genética comparados con (*Chenopodium quinoa*) u otras especies.

La utilidad de AFLP para el estudio de la oca fue probada por Tosto y Hopp (2000), para la determinación de patrones de diversidad e indican haber logrado alto polimorfismo con el marcador AFLP. Así también Schibli (2007) evaluó en dos comunidades de Cusco, reportando alto polimorfismo con los marcadores AFLP.

En el estudio molecular de soya (*Glycine max* L.), se lograron obtener bajos niveles de polimorfismo, esto indica que tiene una limitada diversidad genética en

los cultivos tradicionales, lo cual hace la identificación de marcadores más difícil (Khandka *et. al* 1996).

Los marcadores moleculares AFLP, son originados a partir de regiones de corte con enzimas de restricción específicas o en secuencias específicas que son usadas en este ensayo (Vos *et. al* 1995).

## **CAPÍTULO III**

### **METODOLOGÍA**

La investigación, se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT) de la Universidad Nacional Agraria La Molina-Lima.

#### **3.1 MATERIAL GENÉTICO**

Se evaluaron 26 accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) provenientes del Banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Producción de Camacani (CIP-C) de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Altiplano, distrito de Plateria, provincia y departamento de Puno, las cuales se encuentran en el anexo A.

#### **3.2 DETERMINACIÓN DE DUPLICIDAD EN ACCESIONES DE CAÑIHUA EVALUADAS.**

##### **3.2.1 Investigaciones Previas de Campo**

Para llevar a cabo la investigación, primeramente se sembraron 100 accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) en la campaña agrícola 2004-2005, para determinar el rendimiento en grano por accesión, luego fueron seleccionados 40 accesiones con mayores rendimientos en grano, en promedio mayores a 700 kg/ha, para realizar estudios de caracterización morfológica; como resultado se llegó a determinar la existencia de similitud entre accesiones y en el análisis del



contenido de proteínas el resultado fue en promedio de 15%; posteriormente se seleccionaron 26 accesiones de cañihua con rendimientos en grano mayores a 962 kg/ha y estos se sembraron en las últimas campañas agrícolas 2008-2009, 2009-2010 y 2011-2012 para evaluar los rendimientos persistentes por accesión, en el Cuadro 1 se muestra el listado de las 26 accesiones y sus rendimientos por campaña agrícola y el rendimiento promedio.

### CUADRO 1

**RENDIMIENTO EN GRANO DE 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) SELECCIONADAS DE 100 ACCESIONES PROCEDENTES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DEL CIP CAMACANI EN Kg/ha - CAMPAÑAS AGRICOLAS 2008-2009, 2009-2010 Y 2011-2012**

N° Orden	Claves de Accesiones	CIP Camacani		CIP Illpa	Rendimiento Promedio kg/ha
		Campaña Agrícola 2008-2009	Campaña Agrícola 2009-2010	Campaña Agrícola 2011-2012	
1	03 - 21 - 64	1422	3138	1314	1958.00
2	03 - 21 - 117	1475	3944	2129	2516.00
3	03 - 21 - 124	1600	4000	1094	2231.33
4	03 - 21 - 130	1525	3833	1245	2201.00
5	03 - 21 - 218	1450	4166	1628	2414.67
6	03 - 21 - 230	1425	2333	1600	1786.00
7	03 - 21 - 231	1550	3333	1322	2068.33
8	03 - 21 - 246	1375	3833	1302	2170.00

9	03 - 21 - 267	1625	2777	914	1772.00
10	03 - 21 - 296	1600	1888	1163	1550.33
11	03 - 21 - 301	1400	1666	1524	1530.00
12	03 - 21 - 315	1725	2055	1913	1897.67
13	03 - 21 - 37	1300	2222	1386	1636.00
14	03 - 21 - 27	1300	2500	1217	1672.33
15	03 - 21 - 26	1600	2888	1139	1875.67
16	03 - 21 - 24	1250	4222	1737	2043.00
17	03 - 21 - 23	962	3611	1954	2175.67
18	03 - 21 - 07	1375	4222	1949	2515.33
19	03 - 21 - 03	1850	2222	1926	1999.33
20	03 - 21 - 02	1025	2444	1522	1663.67
21	03 - 21 - 140	1400	2500	1224	1708.00
22	03 - 21 - 146	1600	3888	1670	2386.00
23	03 - 21 - 156	1350	3555	1307	2070.67
24	03 - 21 - 196	1550	4555	1294	2466.33
25	03 - 21 - 204	1650	4444	1522	2538.67
26	03 - 21 - 215	1450	3500	2198	2382.67

### 3.2.2 Colección del Material Vegetal y Trabajo de Laboratorio

En la campaña agrícola 2012-2013, posterior a los estudios previos, para cumplir con los objetivos de la investigación, se sembraron en parcelas de 2 x 4 m<sup>2</sup>, las 26 accesiones de cañihua en el Centro de Investigación y Producción ILLPA, exclusivamente para realizar estudios de caracterización molecular, se colectaron hojas frescas, tiernas y sanas por accesiones de cañihua, las cuales fueron

depositadas en bolsas húmedas de polietileno, envueltas con papel toalla y se mantuvieron en frío en una caja conservadora de tecnopor aproximadamente a 4°C; luego las muestras fueron trasladadas al laboratorio de biología molecular de la Universidad Nacional Agraria La Molina. Se utilizaron de 8 a 10 hojas por cada accesión de cañihua para extraer el ADN.

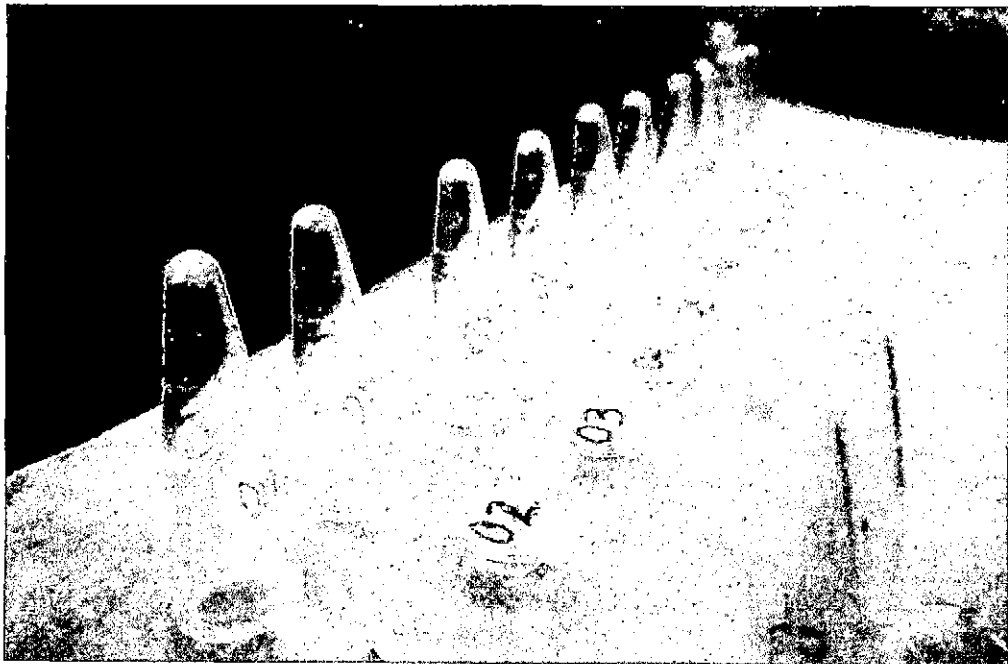
### **3.2.3 Extracción de ADN Genómico**

Se utilizaron protocolos de extracción, método de CTAB, con pequeñas modificaciones (ver el detalle en el anexo 2). El ADN extraído se cuantificó por corrida electroforética en geles de agarosa, Doyle y Doyle (1990), Ferreira y Grattapaglia (1998) y CIP (2000). El protocolo empleado, se describe a continuación:

- Se procesó aproximadamente 100mg de tejido fresco de hojas de cañihua, que se llevó a un mortero pre enfriado con nitrógeno líquido para ser triturado hasta obtener un polvo fino y homogéneo, el mismo que se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml y se agregó 700µl de tampón de extracción CTAB(2X) (Bromuro de hexadeciltrimetil amonio) y 2 µl de β-Mercaptoetanol.
- La mezcla así obtenida, fue incubada a 65°C por 30 minutos en baño maría, agitándolas suavemente cada 10 minutos, con este paso se permite darle tiempo y temperatura óptima al CTAB.
- Luego de la incubación, se dejó enfriar la mezcla a temperatura ambiente, para agregar 700µl de cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1), para la eliminación de proteínas de la solución con ADN. Después de centrifugar la solución de ADN con los solventes, se transfirió cuidadosamente el sobrenadante (que contiene el complejo ADN-CTAB) a un nuevo tubo y fue adicionado 1/10 del volumen de

una solución CTAB (10X) al 10% y 0.7 M NaCl. Nuevamente, se realizó la extracción con cloroformo: alcohol isoamílico (24:1), para obtener ADN más limpio.

- La mezcla obtenida, fue llevada a la centrifuga, para transferir el sobre nadante a un nuevo tubo y adicionar 2/3 del volumen de la solución acuosa de isopropanol. De este modo, se formó un pellet de ADN de la muestra.
- El ADN en forma de pellet, se lavó sucesivamente con 70% y 95% de etanol. Finalmente, el ADN fue secado y resuspendido en 80  $\mu$ l de buffer T10 E1 o agua estéril. TE buffer (1M Tris-HCl/0.5 M EDTA). Para eliminar el ARN, se incubó a 37°C por 30 minutos el ADN resuspendido con ARNasa A (Invitrogen). La Figura 1 muestra el ADN extraído.

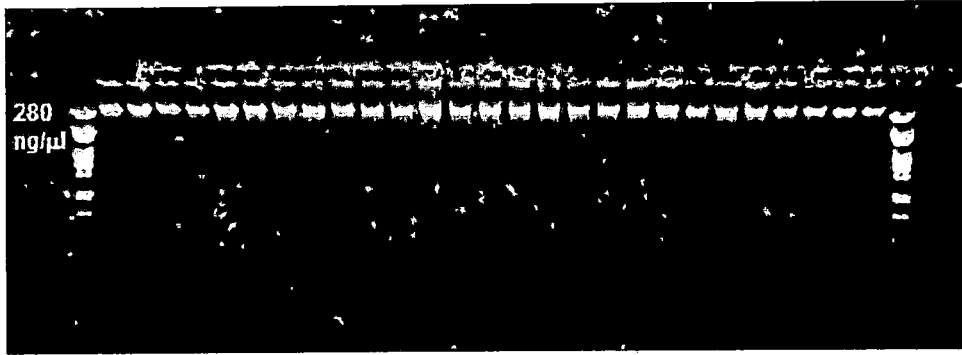


**Figura 1.** ADN Extraído de las 26 accesiones de cañihua. (Primer Semestre 2013)

### **3.2.4 Análisis de Calidad y Concentración del ADN Aislado**

La cuantificación y verificación de la calidad de ADN extraído, fue realizado mediante un análisis comparativo de las muestras extraídas de las accesiones de cañihua en estudio, diluyendo 1 $\mu$ l del ADN extraído en 9  $\mu$ l de tampón de carga (0.25% azul de bromofenol, 0.25% xilencianol, 40% sucrosa y agua destilada) y corridas en el gel de agarosa al 1%. Se coloreó con 1 $\mu$ l de Bromuro de etidio (10mg/ml). La técnica consistió en la utilización de una secuencia ascendente de concentraciones de una solución patrón de ADN del fago-Lambda cortado con la enzima PstI, colocado al extremo del gel de agarosa, con el que se comparó la muestra de ADN de concentración desconocida, el detalle de la corrida electroforética se encuentra en el anexo 3.

El cálculo de las concentraciones de las bandas de ADN, fue bajo luz ultravioleta según la fluorescencia, en el expositor de luz UV. (230 nm de longitud de onda). Esta variación es la más adecuada para la cuantificación, pues ocurre la separación entre el ADN y el ARN, reduciéndose la imprecisión del proceso de cuantificación, cuando el ácido nucleico analizado presenta contaminantes, como la posible presencia de saponina en cañihua u otras impurezas, que se unen al bromuro de etidio. La cuantificación se hizo comparando la intensidad de la banda del ADN con la primera banda del marcador de peso molecular, cuyo tamaño es de 14800 pb y su intensidad corresponde a una concentración de 280ng/ $\mu$ l (Figura 2). El Bromuro de etidio, es un compuesto que se intercala entre las dos hebras del ADN y cuya fluorescencia, inducida por la luz UV es proporcional a la cantidad del ADN en la muestra.



**Figura 2.** Calidad de ADN obtenido en los ensayos de extracción. (Primer Semestre 2013)

Posteriormente, se realizó una dilución de ADN de cada accesión hasta alcanzar una concentración final de 50ng/μl (dilución utilizada para análisis AFLP).

### **3.2.5 Obtención de Marcadores AFLP**

Los marcadores moleculares AFLP fueron detectados siguiendo el procedimiento descrito en el manual AFLP<sup>®</sup> Analysis System I versión B (Vos *et al.*, 1995), con algunas modificaciones, para optimizar la cantidad de reactivos; se optó por el método no radioactivo. Se utilizó el Kit de AFLP<sup>®</sup> I, adquirido de Invitrogen<sup>™</sup> Life Technologies (Carlsbad, California, USA). El procedimiento de la metodología se describe en el anexo 4.

La técnica según Ferreira y Grattapaglia (1998), consta de cuatro pasos a seguir:

- Digestión del ADN genómico total con enzimas de restricción: se realiza con dos enzimas, una de corte raro y otra de corte frecuente, con dicha digestión secuencial se generan tres clases de fragmentos que difieren en las extremidades. Se utilizaron enzimas EcoRI y MseI, con sus respectivos adaptadores para ligamiento.

- Unión de los adaptadores específicos: los adaptadores poseen terminales complementarios a los extremos resultantes del corte con las enzimas de restricción.
- Pre-amplificación de los fragmentos del ADN digeridos y ligados: se seleccionan los fragmentos que serán amplificados, donde los iniciadores utilizados contienen un solo nucleótido arbitrario adicional, con lo que solamente uno de los cuatro pares de bases posibles interviene en la producción de fragmentos amplificados.
- Amplificación selectiva con tres nucleótidos selectivos de los fragmentos de ADN pre-amplificados: esta etapa es la de mayor intensidad de selección, los iniciadores, utilizados poseen otros dos nucleótidos arbitrarios adicionales, con lo que la amplificación se hace más selectiva.

La amplificación de los fragmentos digeridos se lleva a cabo empleando iniciadores con secuencias complementarias a la de los adaptadores y a los sitios de restricción. La especificidad de esta unión es determinada por el número de nucleótidos selectivos que posea el iniciador AFLP, pudiendo no tener ninguno o tener hasta 3 nucleótidos selectivos en su extremo 3' (Vos *et al.*, 1995).

### **3.2.6 Selección de Combinación de Iniciadores AFLP**

Utilizando ADN de 26 accesiones de cañihua, se realizó una selección de iniciadores AFLP, con la finalidad de obtener combinaciones con mayor polimorfismo y con bandas de mayor calidad en nitidez y definición. Con estos criterios se seleccionaron los iniciadores que se utilizaron para la evaluación de todas las accesiones. El Kit AFLP® Analysis System I versión B (Invitrogen),

cuenta con un juego que incluye 8 iniciadores EcoRI y 8 iniciadores MseI, en ambos casos con tres bases selectivas. Con dichos iniciadores se procedió a realizar las combinaciones necesarias hasta encontrar las combinaciones AFLP definitivas. En el anexo 4, se detallan los iniciadores AFLP para EcoRI y MseI evaluados.

### **3.2.7 Electroforesis del Producto Amplificado AFLP**

La electroforesis de los productos amplificados se realizó en geles denaturantes de poliacrilamida al 6%, bajo sistema de electroforesis vertical de Bio-Rad Sequi-Gen GT sequencing Cell. Al producto de la amplificación se le agregó 5ul de tampón de carga para geles de poliacrilamida (formamida 96% v/v, 10mM EDTA pH 8.0, azul de bromafenol 0.05 p/v y xilencianol 0.05 p/v). Posteriormente, las muestras fueron denaturadas a 95 °C por 5 minutos. Inmediatamente después, se cargaron 5ul de las mismas, en el gel de poliacrilamida. El tiempo de corrida, dependió del voltaje aplicado, así como del tamaño de los fragmentos esperados. Se trabajó con dos opciones:

Corridas electroforéticas de 4 horas a 1600V, o toda la noche a 400V, según la disponibilidad de los equipos.

Una descripción más detallada de la preparación de geles de poliacrilamida al 6%, se incluye en el anexo 5.

### **3.2.8 Detección de Marcadores AFLP**

Para la detección de la electroforesis en los geles de poliacrilamida de los productos amplificados se utilizó el método de tinción con Nitrato de Plata, que es un método no radioactivo (Promega Corporation, 2000; CIP, 2000). La



metodología está basada en la reducción del nitrato de plata por el formaldehído, en un medio básico (pH=12) proporcionado por la solución de carbonato de sodio. Los iones de  $\text{Ag}^+$  son reducidos a plata metálica ( $\text{Ag}^0$ ) solamente en la presencia de una biomolécula, como ADN, formando un complejo visible. El protocolo, se detalla en el anexo 6.

### **3.2.9 Registro y Análisis de Datos AFLP**

Se realizó el registro de las bandas polimórficas, donde cada banda de ADN fue considerada como un locus individual, con dos posibles alelos; evaluándose presencia y ausencia para codificarse en el sistema binario, asignando el valor de 1 (uno) para la presencia y cero (0) para la ausencia de la banda, formando la matriz de similitud de los datos de 26 accesiones por 188 marcadores AFLP. La Figura 3 muestra un perfil de amplificación en donde se pueden apreciar las bandas.

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

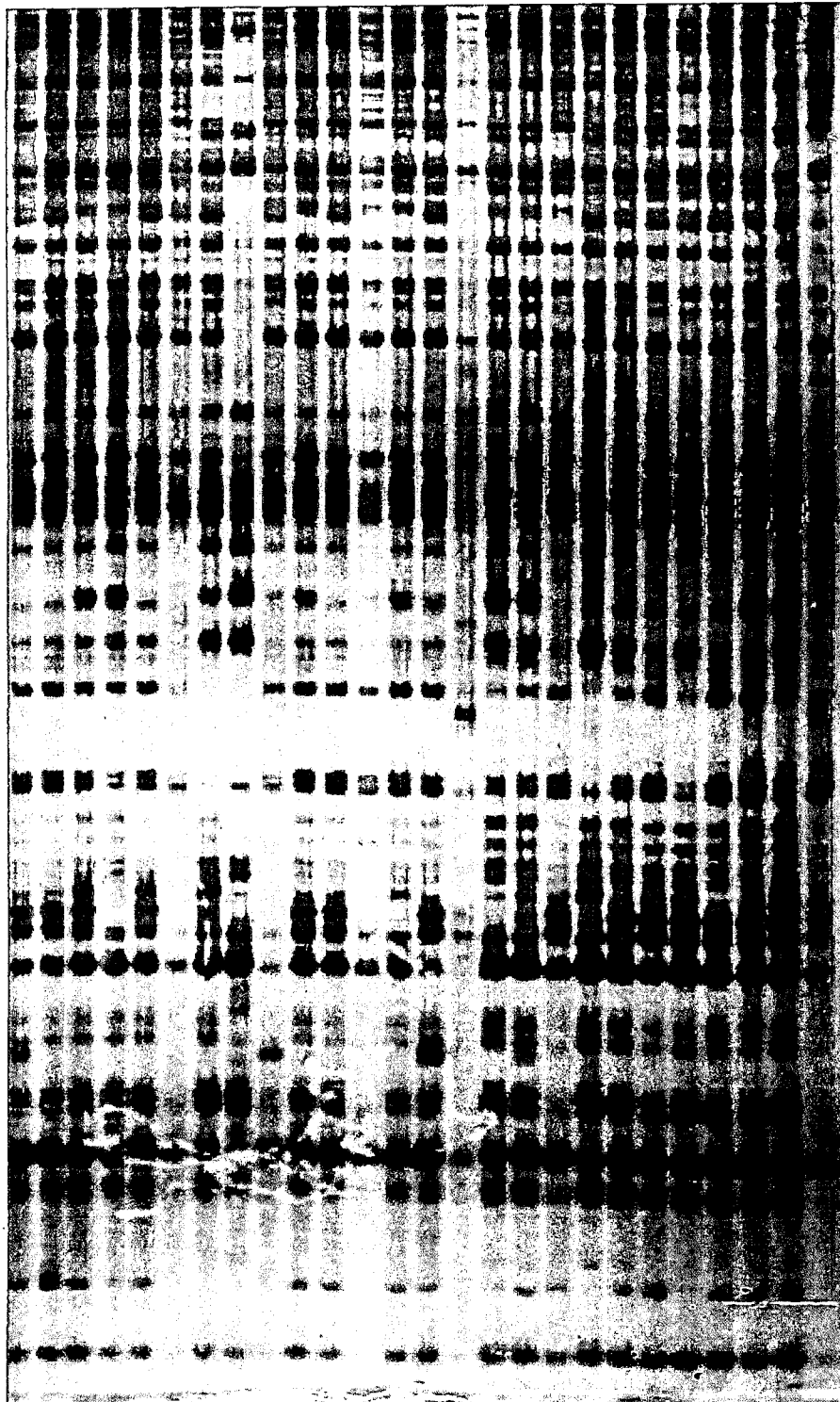


Figura 3. Perfil de amplificación AFLP utilizando la combinación de iniciadores

*EcoRI* ATG/*MseI* CT (Primer Semestre 2013)

### 3.2.10 Matriz Básica de Datos

La matriz básica de datos (MBD) es una matriz rectangular, las OTUs son colocadas en filas y los caracteres analizados en columnas, que son las bandas polimórficas obtenidas previamente. Por tanto la matriz recoge el valor de cada carácter en cada una de las OTU.

### 3.2.11 Coeficiente de Similitud y Matriz de Similitud

El coeficiente de similitud mide la similaridad entre cada par de individuos a partir de la información que proporcionan los caracteres medidos sobre los mismos, mide las coincidencias y diferencias en los caracteres entre dos OTUs, cuando éstos tienen sólo dos estados para cada característica. Los estados son, presencia (codificado con 1) o ausencia (codificado con 0). Si se compara un carácter de doble estado de dos OTUs  $j$  y  $k$ , se presentan cuatro posibilidades que se observan a continuación en el Cuadro 2.

CUADRO 2

COMPARACIÓN DE UN CARÁCTER DE DOBLE ESTADO DE DOS OTUS  $j$  Y  $k$ .

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

Donde:

1,1 <sup>(a)</sup>: Ambas OTUs tienen el carácter comparado.

1,0 <sup>(b)</sup>: El carácter está presente en la primera OTU y ausente en la segunda.

0,1 <sup>(c)</sup>: El carácter está ausente en la primera OTU y presente en la segunda.

0,0 <sup>(d)</sup>: Ambas OTUs presentan ausencia del carácter comparado.

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

El coeficiente seleccionado es el denominado Simple Matching (SM), determinado por la expresión:  $S_{SM} = \frac{a+d}{a+b+c+d}$ .

Con los valores de similitud obtenidos de cualquiera de los coeficientes de similitud para los pares posibles de OTU ordenados en forma tabular constituyen la matriz de similitud; La cual es de tipo diagonal y recoge el valor de similitud entre OTUs. En ocasiones en vez de matrices de similitud se calculan matrices de distancia entre todos los pares posibles de OTUs.

### **3.3 CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y ESTABLECIMIENTO DE GRADO DE ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS ACCESIONES DE CAÑIHUA**

#### **3.3.1. Análisis de Agrupamientos**

El análisis de agrupamientos comprende técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias, forman grupos de OTUs que se asocian por su grado de similitud. El procedimiento a seguir en un análisis de agrupamientos es el siguiente:

1. Examen de la matriz de similitud para localizar el valor de similitud más alto, lo que conduce a la formación del primer núcleo (conjunto formado por dos OTUs).
2. Se busca el próximo valor de mayor similitud, lo que puede suponer:
  - Formación de nuevos núcleos
  - Incorporación de una nueva OTU a un núcleo, con lo que se originaría un grupo (conjunto formado por más de dos OTUs)
  - Fusión de núcleos existentes.
3. Se repite la segunda etapa hasta agotar todas las OTU. El resultado final es la obtención de un dendrograma.

Existen métodos para el cálculo de la similitud entre la OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo al que se incorpora. El más utilizado es el UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method Usin Arithmetic Averages*) "Media aritmética no ponderada".

Según este método las OTUs se incorporan a grupos o núcleos ya formados, teniendo en cuenta que el valor de similitud entre las OTU candidato a incorporarse y el grupo o núcleo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo. Si el candidato a incorporarse es un grupo o núcleo, el valor de similitud será el promedio de los valores de similitud entre los pares posibles de OTU provenientes una de cada grupo o núcleo.

### **3.3.2. Dendrograma**

La estructura taxonómica, obtenida a partir de la matriz de similitud con las técnicas de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente de varias

formas, pero la más utilizada es el dendrograma, que es un diagrama arborescente bidimensional que muestra las relaciones en grado de similitud entre dos o más OTUs. Los valores de similitud se expresan en una escala que puede encontrarse en la parte superior o inferior. Básicamente un dendrograma incluye a dos tipos de gráficos: fenogramas y cladogramas, el primero representa relaciones fenéticas, en cambio, en el segundo las ramificaciones están basadas en las conexiones filogenéticas entre las OTUs (Crisci y López, 1983).

## CAPÍTULO IV

### RESULTADOS Y DISCUSION

#### 4.1 DETERMINACIÓN DE DUPLICIDAD EN ACCESIONES DE CAÑIHUA EVALUADAS

De la evaluación realizada de 16 combinaciones de iniciadores AFLP utilizado en 26 accesiones de cañihua, que son las siguientes: *EcoRI* ATG/*MseI* CTG, *EcoRI* AAG/*MseI* AGC, *EcoRI* ACT/*MseI* AGG, *EcoRI* ACA/*MseI* ATG, *EcoRI* ATG/*MseI* AGG, *EcoRI* AGG/*MseI* ACA, *EcoRI* AC/*MseI* AAC, *EcoRI* AG/*MseI* AGG, *EcoRI* ATG/*MseI* CTA, *EcoRI* AC/*MseI* CTA, *EcoRI* AC/*MseI* ACG, *EcoRI* AGG/*MseI* ATG, *EcoRI* AG/*MseI* AAC, *EcoRI* AAC/*MseI* CTG, *EcoRI* AG/*MseI* AGC y *EcoRI* AAG/*MseI* CTG, no todas las combinaciones de iniciadores presentaron amplificación y polimorfismo, resultando que sólo 3 combinación de iniciadores brindaron mayor polimorfismo, con bandas nítidas y definidas como se puede observar en el Cuadro 3.

**CUADRO 3**  
**COMBINACIÓN DE INICIADORES AFLP EMPLEADOS Y NÚMERO DE**  
**MARCADORES ENCONTRADOS EN 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA DEL**  
**BANCO DE GERMOPLASMA DEL CIP CAMACANI-PUNO. PRIMER**  
**SEMESTRE DEL 2013**

Combinación	Número			Porcentaje
	Total de Bandas	Bandas Monomórficas	Bandas Polimórficas	de Polimorfismo
<i>EcoRI AAG/MseI AGC</i>	69	45	24	34.78
<i>EcoRI ATG/MseI CTG</i>	63	38	25	39.68
<i>EcoRI ACT/MseI AGG</i>	56	37	19	33.92
TOTAL	188	120	68	36.17
Promedio	62.66	40.00	22.66	

Según el Cuadro 3, podemos apreciar que se obtuvieron 188 fragmentos amplificados, de los cuales 68 fueron informativos, con un promedio de 22.66 de bandas polimórficas obtenidas sólo con 3 combinaciones de iniciadores, en cambio las demás combinaciones de marcadores moleculares mostraron bajo poder de detección del polimorfismo en el genoma total de las accesiones de cañihua, esto posiblemente sea debido a una limitada diversidad genética en cultivos tradicionales, lo que hace que la identificación con marcadores moleculares sea más difícil (Khandka *et. al*, 1996), sin embargo Lanaud y Lebot (1995), hacen conocer que la tecnología de marcadores moleculares es una nueva alternativa para que los recursos genéticos puedan evaluarse y



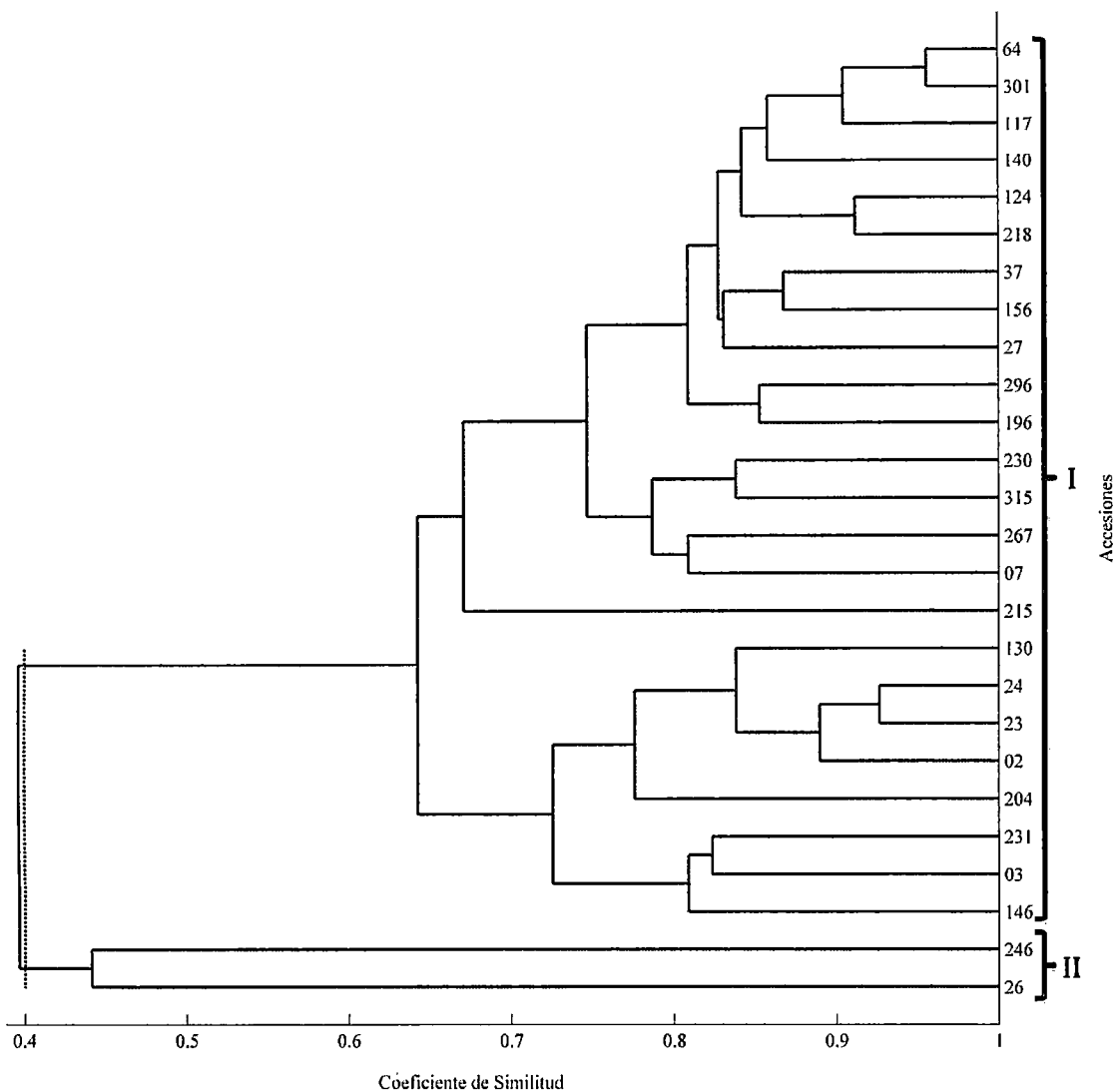
caracterizarse a nivel de ácido desoxirribonucleico DNA y que es apropiado para explicar la diferencia de la diversidad genética de las especies a través de las bandas polimórficas, componentes importantes en la secuencia específica de las hebras de cadena de nucleótidos de DNA en el genoma total. Por otra parte, en la comparación con distintos marcadores moleculares para evaluar diversidad genética en accesiones de cebada (*Hordeum vulgare*), se reportó que el empleo de marcadores AFLP brindó mayor información que al usar marcadores RAPD, RFLP o ISSR (Russel *et. al*, 1997), por consiguiente la utilización de marcadores AFLP es una tecnología adecuada para caracterizar las accesiones de cañihua. Vargas *et. al* (2010), manifiestan que, una colección de 43 genotipos silvestres y cultivares de cañahua, procedentes de Bolivia-Perú, fueron evaluados usando 192 marcadores microsatélites para indagar el polimorfismo, y en esta prueba lograron obtener 161 (85%) de productos simples de amplificación, en base a la tecnología de biología molecular PCR; en conclusión de cualquier forma, solo 36 fueron bandas polimórficas informativos, en las cuales la amplificación selectiva con dinucleótidos adenina y timina (AT), generaron mayor polimorfismo en los cultivares de cañahua, en efecto los marcadores AFLP utilizados en la presente investigación son más eficientes, porque es una combinación de las tecnologías RFLP y PCR. Gupta *et. al* (2004), indica que un marcador molecular es un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia), cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida; el autor en mención también indica que, en la actualidad, se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo que permiten analizar la totalidad de la información genética (genoma) de un

organismo. El contenido genético del ADN detectada mediante el uso de marcadores moleculares, se ha convertido en una herramienta para identificar las características que están relacionadas con la resistencia a enfermedades, producción, calidad, etc.; en la presente investigación se emplearon marcadores moleculares para determinar la duplicidad de accesiones en el Banco de Germoplasma del CIP Camacani. Su uso eficiente en la agricultura ha sido útil en estudios taxonómicos y filogenéticos de cultivos de importancia económica, así como también para la caracterización e identificación de genotipos (Philips y Mora, 1995). Por su parte Ferreira y Grattapaglia (1998), señalan que la técnica AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción, con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismo usando PCR y esto permite detectar la existencia o no del total de caracteres en común entre las accesiones de cañihua en estudio, dicha presencia se puede representar inicialmente en una matriz básica de datos, a partir de la misma, con la elección adecuada del coeficiente de similitud (SM para el caso de este estudio), se construye una Matriz de Similitud, en la cual en ningún caso entre 2 OTUs diferentes se aprecia el valor "1", que representa la total coincidencia de caracteres evaluados, la no existencia de "1", implica que entre las accesiones evaluadas no existe duplicidad.

#### **4.2 CONSTRUCCIÓN DE DENDROGRAMAS Y ESTABLECIMIENTO DE GRADO DE ASOCIACIÓN DE DISTANCIAS GENÉTICAS ENTRE LAS ACCESIONES DE CAÑIHUA**

El dendrograma obtenido como resultado del análisis de agrupamiento de las 26 accesiones de cañihua a un coeficiente de similitud de 0.4, las misma que se

muestra en la Figura 4, se puede observar que hay formación de dos grupos, de los cuales el grupo I agrupa a 24 accesiones con caracteres en común o similares, frente al grupo 2 que solo está conformado por dos accesiones con códigos 264 y 26, es decir las secuencias específicas de ADN del genoma total de este grupo son diferentes al grupo 1 pero entre si son similares.



**Figura 4.** Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua con tres marcadores AFLP a un coeficiente de similitud de 0.4 (Primer semestre 2013).

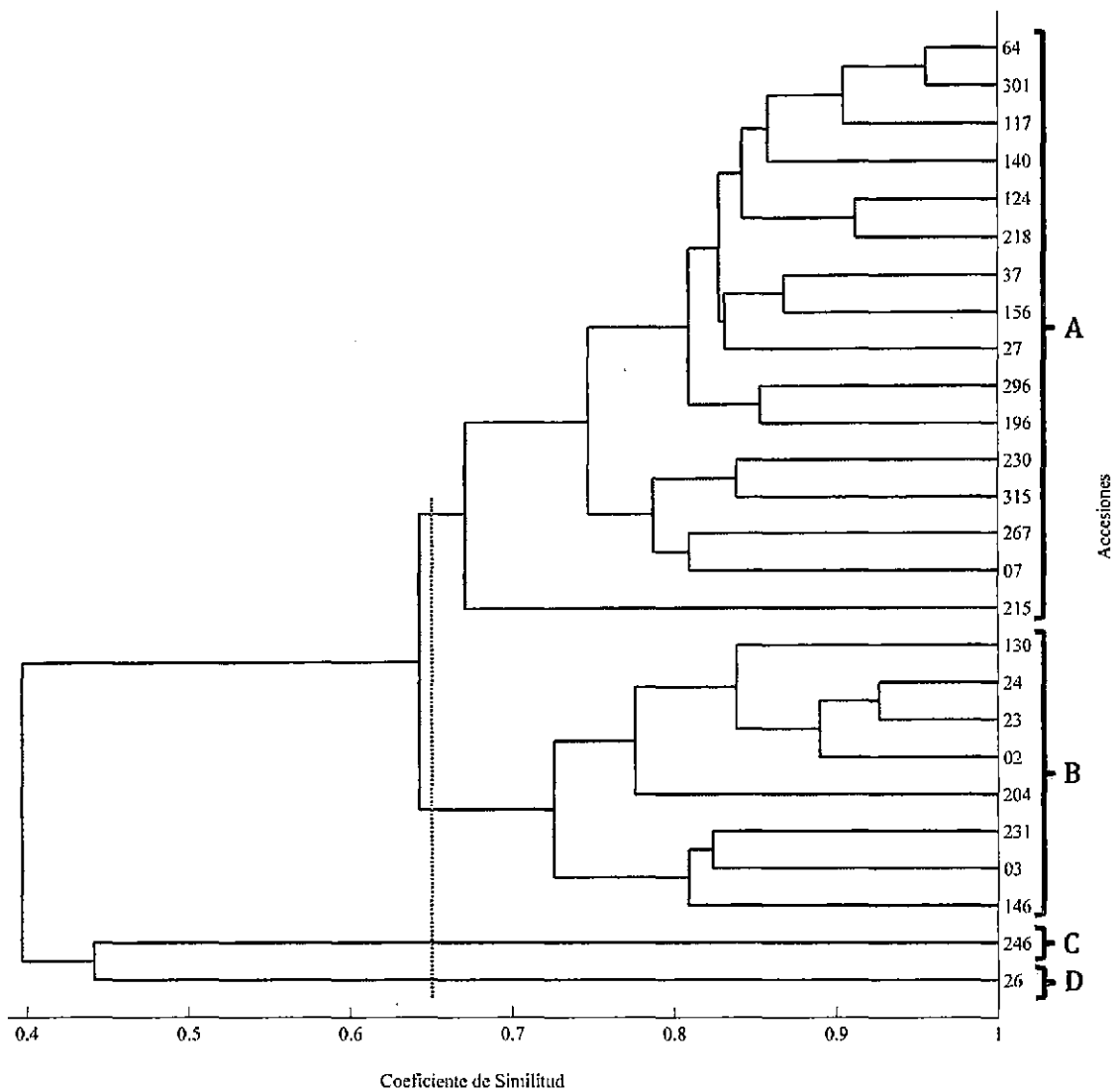
En el presente trabajo para el análisis de agrupamiento se utilizó el método UPGMA para la búsqueda de la distancia más pequeña en la matriz de distancias genéticas y agrupar las 26 accesiones de cañihua de una misma especie que la conforman como una sola unidad taxonómica independiente. Para lograr los resultados se calcularon los promedios de la nueva unidad taxonómica contra los restantes, creando una nueva unidad taxonómica y se repitió el proceso hasta que todas las accesiones queden unidas a un único elemento (ancestro hipotético) y esto es refrendado con los argumentos de los siguientes autores:

Crisci y Lopez (1983), confirman que los coeficientes de similitud cuantifican el parecido o similitud entre OTUs, siendo la matriz de similitud la representación de estos resultados; ambos coeficientes, miden las coincidencias y diferencias en los estados de los caracteres entre dos OTUs y se aplican principalmente a datos doble estado. Por otra parte la elección del coeficiente de similitud depende de la matriz básica de datos, generalmente se usa el coeficiente de asociación, para los datos doble estado. Así mismo Crisci y Lopez (1983), hacen conocer que uno de los métodos de agrupamiento más empleado, sobre todo en el análisis de diversidad genética con marcadores moleculares es conocido como UPGMA (*Unweighed Pair-Group Method Usin Arithmetic Averages*) o sea media aritmética no ponderada. Por su parte Sevilla y Holle (2004), señalan que, la elección del coeficiente de similitud depende del tipo de datos que constituyan la matriz básica de datos MBD, generalmente los coeficientes de asociación y de distancia se utilizan para los datos doble estado y por otra parte Winzer *et. al* (2004), mencionan que dos muestras, son más parecidas cuanto más “unos” compartan y la coincidencia de “ceros” no aporta a la similitud, es decir, no considera dobles ausencias para no sobre estimar la similitud a partir de características que no

están presentes en ninguno de los dos individuos. En tanto que, para Sokal *et. al* (1963), dos muestras deberán considerarse más asociadas tanto cuando comparten unos (1,1) como ceros (0,0), ya que la codificación que se les asigna es indistinta. Rolff (2000), reporta que, la estructura taxonómica obtenida de la matriz de similitud, con la técnica de análisis de agrupamiento puede representarse gráficamente utilizando un dendrograma, el cual es un diagrama arborescente que muestra la relación del grado de similitud entre dos OTUs o grupos de OTUs. Los valores de similitud se expresan en una escala de cero a uno que puede encontrarse en la parte superior o inferior del dendrograma, (Crisci y López, 1983). Para Sokal y Sneath (1963), la taxonomía numérica es una herramienta en la clasificación de individuos y es definida como la evaluación numérica de la afinidad o similitud entre unidades taxonómicas y el agrupamiento de estas unidades en taxones, basándose en el estado de sus caracteres que pueden ser fenotipos y genotipos. La taxonomía numérica según Crisci y López (1983), exige que todos los datos deben ser expresados en forma cuantitativa, de modo que sean computables; como no todos los caracteres se pueden expresar de este modo, algunos deben ser sometidos a una transformación para poder trabajar con ellos por ejemplo con datos de origen morfológico; en cambio cuando se trabaja con datos de doble estado no es necesario la transformación, porque ya indican presencia/ausencia de un carácter; señalan también que los marcadores moleculares, son un ejemplo de este tipo, es decir en este caso se trata de la presencia /ausencia de un determinado marcador molecular como 1 la presencia y 0 la ausencia respectivamente. En la presente investigación con la utilización de marcadores moleculares se generan datos de doble estado cumpliendo con los criterios planteados por la taxonomía numérica. Gonzáles y Pita (2001), hacen

conocer que la matriz básica de datos (MBD) es una matriz rectangular, colocado en filas las OTU y en columnas los caracteres analizados; por tanto la matriz recoge el valor de cada carácter en cada una de las OTU y que es básico para los cálculos de coeficiente de similitud y explicar el grado de asociación de similitud o el grado de parentesco, el cuadro 5 representa la MBD obtenida con los criterios mencionados.

En el análisis del dendrograma a un coeficiente de similitud de 0.65, se muestra la existencia de cuatro subgrupos que se desprenden de los grupos I y II, el grupo I alberga a los subgrupos A y B, los cuales poseen 16 y 8 accesiones respectivamente, mientras que los subgrupos C y D que se desprenden del grupo II están conformados únicamente por una accesión cada uno, lo cual se observa en la Figura 5; es decir, cuando el coeficiente de similitud es mayor a 0.5, es más exigente en la similitud de caracteres entre las OTUs de cañihua, razón por la cual se muestra la formación y agrupación de más grupos, ósea se alejan las similitudes entre grupos, pero si son similares entre sí en algunas secuencias específicas de segmento de DNA.



**Figura 5.** Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua con tres marcadores AFLP a un coeficiente de similitud de 0.65 (Primer semestre 2013).

De acuerdo a los dendrogramas obtenidos, genotípicamente a mayor coeficiente de similitud se generan más grupos, por ejemplo los colores de las accesiones podrían tener alguna relación con la diferenciación de grupos a partir del análisis de agrupamiento realizado, los siguientes autores establecen el criterio necesario para hacer un adecuado análisis de agrupamiento:

Sokal y Sneath (1963), al comparar los caracteres de dos OTUs de obtener su grado de similitud se tendrá en cuenta cuántos de estos caracteres son compartidos entre dos OTUs con relación al total de caracteres, y esta similitud se hará cada vez más estable, conforme el número de caracteres evaluados aumente. La determinación del coeficiente de similitud genética entre individuos de una población, es importante, porque a partir de ella se puede realizar correctamente los análisis de agrupamiento y diversidad. No existe un coeficiente de similitud universalmente reconocido para el análisis con marcadores moleculares; además se debe considerar no solo los resultados que se obtengan con los diferentes coeficientes de similitud, sino también el carácter dominante o codominante del marcador empleado y la ploidía del organismo en estudio (Kosman y Leonard, 2005).

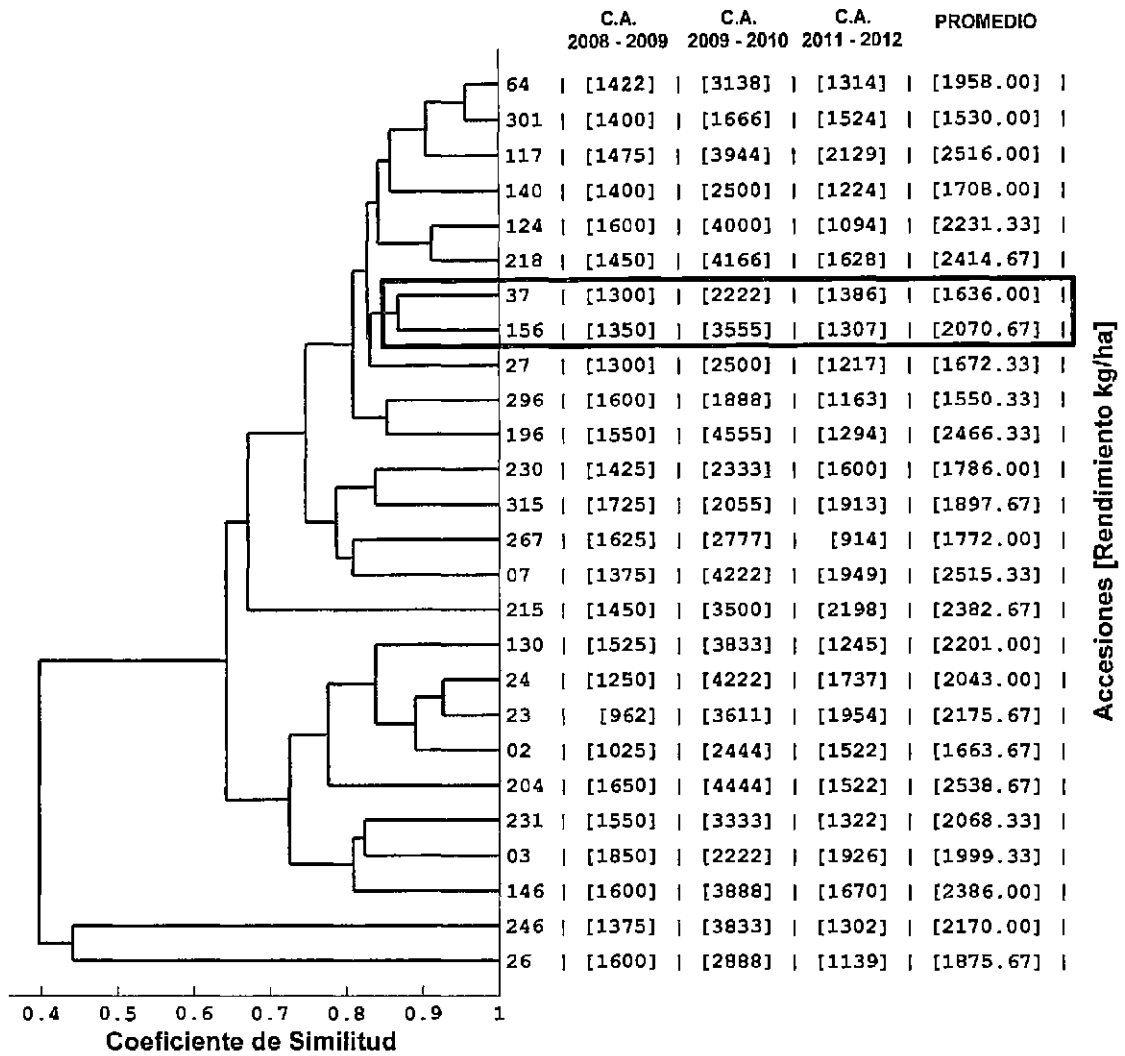
Por otro lado considerando la forma de reproducción autogama y que la procedencia de las 26 accesiones evaluadas son de localidades que se encuentran geográficamente muy cercanas en la región del altiplano Puno, la base genética de las accesiones evaluadas no es muy amplia y en estos casos la ausencia conjunta de un marcador (0,0) podría considerarse indicativo de alta similitud, Kosman y Leonard (2005); por otro lado estos autores, sostienen que parece que existe un alto grado de similitud en la secuencia de ADN de una misma especie eucariota y que no se tiene una manera exacta de determinar la diversidad genética de organismos poliploides empleando marcadores dominantes, por tal razón los resultados se deben contemplar como un estimado basado en una similitud fenotípica. El coeficiente de Simple Matching o Coeficiente de Concordancia Simple (SM), considera que la ausencia corresponde a loci homocigóticos. Puede utilizarse con marcadores dominantes o



codominantes, por cuanto las ausencias podrían corresponder a homocigotos recesivos.

Finalmente observando en el dendrograma a un coeficiente de similitud de 0.96-1.0, se puede ver que hay una diferenciación total entre las accesiones analizadas, por tanto no existe duplicidad entre las accesiones empleadas para el análisis de agrupamiento usando la técnica AFLP, es decir el genoma total de las 26 accesiones no son iguales; teniendo en cuenta lo mencionado y sobre la base genética de las accesiones evaluadas de cañihua, se realizó el análisis de diversidad con el Coeficiente de Concordancia Simple (SM), por considerarlo adecuado, por otorgar igual peso valorativo tanto al número de loci de bandas compartidas (1,1) como al loci con ausencia compartida de bandas (0,0); específicamente para la presente investigación; de ningún modo podemos generalizar para investigaciones en las que se evalúan más de una especie, subespecies o accesiones procedentes de áreas geográficas amplias. Al emplear el coeficiente SM, en el dendrograma obtenido para las 26 accesiones de cañihua con los marcadores AFLP, se deduce que en dichos resultados no existen accesiones duplicadas, puesto que no se encontraron dos accesiones que tuvieran el mismo patrón de bandas (Kosman y Leonard, 2005).

En el Cuadro 1 de la pág. 23 y la figura 6 que se muestra a continuación.



**Figura 6.** Dendrograma que agrupa 26 Accesiones de Cañihua – Comparativo Campañas Agrícolas (Primer semestre 2013).

Se observa que todas las accesiones analizadas poseen buenos rendimientos, porque han sido seleccionadas a partir de trabajos de investigaciones previos, se puede asumir entonces que poseen similares características genéticas asociadas al rendimiento, el trabajo de investigación se realizó para evaluar la posible o no

existencia de duplicados entre este subconjunto de Cañihuas de mayor rendimiento.

Las pruebas de caracterización molecular realizadas no son concluyentes respecto a la característica de rendimiento de Cañihua. La técnica AFLP actúa solamente sobre las cadenas genéticas de las diferentes accesiones, y como resultado de dicha técnica se obtiene un dendrograma que muestra la similitud entre las accesiones, pero dicha similitud es entre las cadenas genéticas y esto implica también otras características además del rendimiento, la técnica AFLP no está estrictamente asociada al rendimiento u a otra característica en particular, únicamente muestra la similitud general entre accesiones.

Habiendo establecido lo anterior, es posible apreciar aparentemente, asociaciones en cuanto al rendimiento pero no son concluyentes, por ejemplo las accesiones 37 y 156 tienen un coeficiente de similitud de 0.868 entre ellas, sus rendimientos en las campañas agrícolas 2008-2009 y 2011-2012 son muy cercanos, pero difieren notablemente en la campaña agrícola 2009-2010, se podría deducir entonces que otros factores como los ambientales, podrían haber sido determinantes para la producción de Cañihua, inclusive con un alto coeficiente de similitud, (Mamani y Callohuanca, 2006).

Para que los materiales genéticos, puedan ser intercambiados y conservados para fines de mejoramiento, es necesaria una correcta clasificación e identificación, con el propósito de mantener adecuadamente la diversidad genética, así como también para evitar duplicados y considerando que el principal objeto del estudio de la diversidad genética es dar un uso adecuado y oportuno al banco de germoplasma con el que se cuenta en el CIP Camacani. Los métodos

biotecnológicos como los marcadores moleculares vienen a constituir una herramienta para un manejo adecuado de dicha diversidad, Castillo (1996).

La diferencia de variabilidad de la diversidad genética en accesiones de cañihua (*Chenopodium pallidicaule* Aellen) posiblemente sea a la naturaleza de su reproducción autógena y la influencia humana, importante en la dinámica de su diversidad. Muchas de estas diferencias pueden deberse también al poder de detección de frecuencias alélicas generadas a través de marcadores genéticos, tamaño de la muestra y el número de loci estudiados. Así mismo se atribuye que las diferencias genéticas pueden ser el resultado del proceso selectivo de selección y refrescamiento al que se ha sometido constantemente este cultivo (Mamani y Callohuanca, 2006).

## CONCLUSIONES

**PRIMERA.-** El análisis de caracterización molecular de 26 accesiones de cañihua, se realizó mediante los marcadores moleculares AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados), por ser un método apropiado y sensible para caracterizar el ADN del tejido de plantas, cualquiera que sea su origen y su complejidad, la que permitió la detección de polimorfismo en forma confiable para el estudio de la diversidad genética en el cultivo de la cañihua.

**SEGUNDA.-** La construcción del dendrograma a partir de la información proveniente del empleo de la técnica AFLP, muestra la formación de dos grupos con un coeficiente de similitud de 0.4, grupo 1 con 24 accesiones y grupo 2 con 2 accesiones, mientras que a un coeficiente de similitud de 0.65 se generaron cuatro grupos, el primer grupo alberga 16 accesiones, el segundo grupo alberga 8 accesiones y los dos últimos grupos sólo están conformado por una accesión cada uno.

**TERCERA.-** El análisis AFLP y los polimorfismos generados, representados en el dendrograma a un coeficiente de similitud de 1.0, muestran la inexistencia de duplicados entre las 26 accesiones de cañihua en estudio, determinando de esta

forma la factibilidad de conservar individualmente dichas accesiones en el Banco de Germoplasma del CIP Camacani.

**CUARTA.-** Las accesiones con mayor persistencia en rendimiento grano promedio durante las campañas agrícolas 2008-2009, 2009-2010 y 2011-2012 son: 204 (2538.67 kg/ha.), 117 (2516.00 kg/ha.), 07 (2515.33 kg/ha.), 196 (2466.33 kg/ha.), 218 (2414.67 kg/ha.), 24 (2403.00 kg/ha.), 146 (2386.00 kg/ha.), 215 (2382.67 kg/ha.) y así sucesivamente.

## RECOMENDACIONES

- Realizar el análisis de diversidad genética del total de accesiones de cañihua existentes en el Banco de Germoplasma del Centro de Investigación y Producción Camacani de la Facultad de Ciencias Agrarias, empleando las diversas técnicas que involucran marcadores moleculares.
- Ampliar los estudios de diversidad genética, con estudios de caracterización morfológica que permitan establecer una correlación entre ellos.
- Evaluar en las accesiones de cañihua estudiadas, los genes relacionados a los factores intervinientes durante el periodo vegetativo de la planta, que permiten obtener altos rendimientos en grano.

## BIBLIOGRAFÍA

- AKERMAN, S., J. TAMMISOLA, M. REGINA, AND V. KAUPPINEN. 1996  
Segregation of AFLP markers in *Betula pendula* (Roth). *Forest Gen.* vol. 3  
pp. 117-123.
- ALBERTS *et al.* 1994. *Molecular biology of the cell* Garland, New York. London,  
pp. 29-292.
- ALONSO S.I. 2003. Characterization of *Paspalum dilatatum* using RAPD. XXIX  
Jornadas Argentinas de Botánica y XV Reunión Anual de la Sociedad  
Botánica de Chile. pp. 241-242.
- BECERRA, V. y M. PAREDES. 2000. Uso de marcadores bioquímicos y  
moleculares en estudios de diversidad genética. *Agricultura técnica* 60(3):  
pp. 270-281.
- CALLE, E. 1979. Morfología y variabilidad de las cañihuas cultivadas. In. II  
Congreso Internacional sobre cultivos Andinos. Riobamba- Ecuador.
- CASTILLO, O. 1996. La biotecnología en la conservación y usos de la  
agrodiversidad. INIAP. Chile 6:5-17.
- CHERVIN. 1908. Citado por Hunziker (1952) *Taxonomía de la cañihua*  
(*Chenopodium pallidicaule* Aellen). Suecia.



- CIP. 2000. Molecular Biology laboratory protocols: Plant genotyping, M. Ghislain, D. Zhang, Ma. Del. R. Herrera (Eds). Crop. Improvement and Genetic Resources. Septentrio Training Manual. 3ra Edition (revised October 2000). Lima-Perú.
- CRISCI, J., LÓPEZ, M. 1983. Introducción a la teoría y práctica de la taxonomía numérica. Monografía N° 26, Serie de Biología, Programa de Monografía Científicas, OEA, Washington D.C., USA. 128p.
- DOMÍNGUEZ, G.A. 2002 Caracterización Molecular de Sangre de Grado (*Groton sp*) de uso Medicinal mediante Marcadores RAPDs y AFLPs – UNALM pp. 83-84.
- DOYLE, J., J. DOYLE. 1990. Isolation of ADN from small amounts of plant tissues. Focus 12-13 modified at the NCSU Forest Biotechnology Laboratory.
- ETIENNE, J. 1999. Manual de bioquímica genética y biología molecular. Faculte de Medicina Saint- Antoine. (Pariz. VI). pp. 491.
- FERREIRA, M., D. GRATTAPAGLIA. 1998. Introducción al uso de Marcadores Moleculares en el Análisis genético 1ed. Brasilia. EMBRAPA- CENARGEN documento 222pp.
- GANDARILLAS, H. 1968. Número de cromosomas de la cañihua. I convención de Quenopodiaceas. Facultad de Agronomía. UNTA. Puno-Perú.
- GANDARILLAS, H. y J. GUTIERREZ. 1979. Mejoramiento genético en: Quinoa y Kañihua. Cultivos Andinos, serie de libros y materiales educativos N°49, CIID-IICA. Bogota, Colombia, pp. 65-82.
- GONZÁLES, A. PITA J.M. 2001. Conservación y Caracterización de Recursos Filogenéticos. I.N.E.A. Valladolid. 279pg.

- GUPTA P. K. y RUSTGI S. 2004. Molecular markers from the transcribed, expressed region of the genome in higher plants. *Functional and Integrative Genomics* 4: 139-162pp.
- HUNZIKER, A. T. 1952. Los pseudocereales de la agricultura indígena en América. *Mus. Bot. Córdoba. Publ. Mex* 3.
- INIA. 1994. Programa Nacional de Cultivos Andinos, Dirección General de Transferencia de Tecnología, E.E. Andenes Cusco- Perú.
- KHANDKA, D., A. NEJIDAT AND A. GOLAN-GOLDHIRSH 1996. Polymorphism and DNA markers for asparagus cultivars identified by random amplified polymorphic DNA *Euphytica* 87: 39-44pp.
- KIM, M., P. MOORE, F. ZEE. M. FITCH, D. STEIGER, R. MANSCHARDT, R. PAUL, R. DREW, T. SEKIOKA, R. MING. 2002. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45: 503-512pp.
- KOSMAN, E., J. Leonard. 2005. Similarity coefficient for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid and polyploid species. *Molecular Ecology* 14: 415-424pp.
- LANAUD, C., V. Lebot. 1995. Molecular techniques for increased use genetic resource. In: *Molecular genetic techniques for plant genetic resources. Report of an IPGRI, workshop 9-11. October 1995. Rome, Italia.* 92-97pp.
- LEON, J. 1964. Plantas alimenticias andinas. *Boletín técnico N° 6.* Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la Zona Andina. Lima, Perú. 112pp.
- MAMANI, E. Y CALLOHUANCA, A. 2006 *Manejo y Cultivo de Cañihua.* Departamento Académico de Agronomía y Zootecnia – Facultad de Ciencias Agrarias - UNA Puno.

- MELGAR, A.L. 2012. Análisis de la diversidad genética de 50 accesiones de habas (*Vicia faba* L.) mediante marcadores moleculares AFLP en la Región de Huancavelica pp. 65-67.
- MINAG-DRA. 2002. Producción y Rendimiento de la Cañihua – Puno.
- MONTALDO Hugo H, MEZA-HERRERA Cesar A. 1998. Use of Molecular Markers and major genes in the genetic improvement of livestock. Electronic Journal of Biotechnology ISSN: 0717-3458 Vol.1 No.2, Universidad Católica de Valparaiso, Chile.
- MUJICA, A., JACOBSEN, S. 1998. Diversidad Genética y Variabilidad de los Cultivos Andinos. Puno – Perú.
- NAGATOMY R.A. 2011. Análisis Molecular de la Variabilidad Genética de accesiones peruana (*Oxalis tuberosa* Molina) oca de Kitchki-Huánuco UNALM pp. 35-36.
- PAREDES, C. 1963. Estudio agrobotánico de la cañihua. Tesis Ing. Agr. Universidad Nacional San Antonio de Abad- Cusco, Perú.
- PAUL, S., F. WACHIRA, W. POWEL, R. WAUGH. 1997. Diversity and genetic differentiation among population of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* L. O. Kuntze) revealed by AFLP markers. Theoretically and Applied Genetics 94: 255-263pp.
- PHILIPS, MORA, W. RODRÍGUEZ, P. FRITZ 1995. Marcadores moleculares de ADN: teoría, aplicaciones y protocolos de trabajo, CATIE: Unidad de Biotecnología. Turrealva, Costa Rica pp. 33-42
- PROMEGA CORPORATION, 2000. Silver sequence TM. DNA. Sequencing system Technical manual. EEUU.

- ROLFH, F. 2000. NTSYS PC Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis for the IBM PC Microcomputers (and compatibles). Versión 2.1 User Guide. Applied Biostatistics Inc. Stony Brook, New York, USA. 39pp.
- RUSSEL, R., D. FULLER, M., MACAULAY, G., HATZ, A., JAHOOOR, W., POWEL, R., WAUGH. 1997. Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLP, AFLP, SSR and RAPD. *Theoretically and applied genetics* 95: 714-722pp.
- SCHIBLI R. 2007. Análisis de la diversidad genética de (*Oxalis tuberosa* Molina) oca de dos comunidades de Cusco usando marcadores AFLP - UNALM.
- SEVILLA, R., M., HOLLE. 2004. Recursos Genéticos Vegetales. Universidad Nacional Agraria La Molina, Lima, Perú. Centro Internacional de la Papa, Lima, Perú.
- SNEATH, P., R. SOKAL. 1973. Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification. USA. Freeman.
- SOKAL, R., P. SNEATH. 1963. Principles of numerical taxonomy: USA. Freeman 319 p.
- Soukup, J. 1992. Vocabulario de los Nombres Vulgares de la Flora Peruana y Catalogo de los géneros. Editorial Salesiana. Lima, Perú.
- TANG, T., Y. ZHONG, S. JIAN, SHI 2003. Genetic diversity of *Hibiscus tiliaceus* (Marvaceae) in China assessed using AFLP. Markers. *Annals of Botany* 92: 409-414pp.
- TAPIA, M. 1979. Cultivos Andinos Subexplotados y su aporte en la alimentación. FAO. Santiago de Chile- Chile.
- TOSTO D. AND H. HOPP 1996. Sequence analysis of the 5.8S ribosomal DNA and internal transcribed spacer (ITS1 and ITS2) from five species of the

- Oxalis tuberosa* alliance. DNA Sequence the Journal of Sequencing and Mapping (Netherlands) 6: 36-364 pp.
- VALLENAS, M. y V. CARPIO. 1974. La cañihua y su cultivo. Boletín N° 25. Ministerio de Agricultura. Zona Agraria XII. Puno- Perú. 33 p.
- VARGAS A., ALZINGA B. D., ROJAS – BELTRAN A.J., BONIFACIO A., GEARY B., STEVENS R. M., JELLEN M. E y MAUGHAN J. P. 2010. Development and use of microsatellite markers for genetic diversity analysis of cañihua (*Chenopodium Palledicaule* Aellen). Department of Plant and Wildlife Sciences, Brigham. Young University pp. 2- 44
- VARGAS y BERTOÑO, 1938. Citado por Hunziker (1952). Historia de la cañihua “Quinoa silvestre a la que llaman cañihua” – Suiza.
- VELASCO, B., M. L. 1970. Ecotipos de cañihua del departamento de Puno y sus investigaciones. Tesis Ing. Agr. Facultad de Agronomía. Puno- Perú. 151p.
- VERASTEGUI J. 2009. Biodiversidad Latino americana: cañihua o cañahua.
- VOS, P., R. HOGERS, M. BLEÉKER, M. REIJANS, T. VAN DE LEE, M. HOMES, A. FRIJITERS, J. POT, J. PELEMAN, M. ZABEAU. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. Nucleic Acids Reserch 23: 4407-4414.
- WATSON J. D., BAKER T. A. BELL S. P., GANN A., LEVINE M. AND LUSICK Y. R. 2006. Biología Molecular del Gen 5° edición, Ed, Medica. Panamericana. Madrid. 69p.
- WINZER, N., RENZO, M., OLMOS, S. 2004. Métodos para Estimar la Variabilidad Genética. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Ed. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria INTA. Argentina.
- ZHANNG, D. J. CERVANTES, Z. HUAMÁN, E. CAREY, M. GHISLAIN. 200. Assesing genetic diversity of sweet potato (*Ipomoea batatas* L. Lam)

cultivars from tropical America using AFLP. *Genetic Resources and Crop Evolution (Netherlands)* 47 (6): pp. 656-665.

## **ANEXOS**

**CUADRO 4**

**RELACIÓN DE ACCESIONES DE "CAÑIHUA" (*Chenopodium pallidicaule*  
Aellen) EVALUADAS – PRIMER SEMESTRE 2013**

Las accesiones provienen del Centro de Investigación y Producción  
Camacani, distrito de Platería, Provincia y Departamento de Puno.

N° ORD	Registro de códigos en Banco Germoplasma	Localidad Provincia - Distrito	Año de Recolección
1	03 - 21 - 64	Azángaro - Putina	1977
2	03 - 21 - 117	Melgar - Ayaviri	1977
3	03 - 21 - 124	Melgar - Ayaviri	1977
4	03 - 21 - 130	Melgar - Ayaviri	1977
5	03 - 21 - 218	Azángaro - Asilo	1977
6	03 - 21 - 230	Azángaro - Putina	1977
7	03 - 21 - 231	Azángaro - Putina	1977
8	03 - 21 - 246	Puno - Puno	1977
9	03 - 21 - 267	Puno - Puno	1977
10	03 - 21 - 296	Melgar - Ayaviri	1977
11	03 - 21 - 301	Melgar - Ayaviri	1977
12	03 - 21 - 315	Melgar - Ayaviri	1977
13	03 - 21 - 37	Huancané - Taraco	1977
14	03 - 21 - 27	Huancané - Taraco	1977
15	03 - 21 - 26	Huancané - Taraco	1977
16	03 - 21 - 24	Huancané - Huancané	1977
17	03 - 21 - 23	Huancané - Huancané	1977

18	03 - 21 - 07	Azángaro - Putina	1977
19	03 - 21 - 03	Azángaro - Putina	1977
20	03 - 21 - 02	Azángaro - Putina	1977
21	03 - 21 - 140	Azángaro - Jacco	1977
22	03 - 21 - 146	Azángaro - Jacco	1977
23	03 - 21 - 156	Azángaro - Jacco	1977
24	03 - 21 - 196	Melgar - Ayaviri	1977
25	03 - 21 - 204	Melgar - Ayaviri	1977
26	03 - 21 - 215	Melgar - Ayaviri	1977



CUADRO 5

MATRIZ BÁSICA DE DATOS DE LAS 26 ACCESIONES DE CAÑIHUA –  
PRIMER SEMESTRE 2013

	Marcador	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	
L1	EcoRI AAG/ Msel AGC	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1		
L2		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	
L3		0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
L4		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
L5		0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	
L6		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	
L7		0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	
L8		1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0
L9		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L10		0	0	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
L11		1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1
L12		0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
L13		1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0
L14		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L15		0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0
L16		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1
L17		1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
L18		0	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0
L19		1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1
L20		1	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0
L21		1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0
L22		1	0	0	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
L23		0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
L24		0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0
L25	EcoRI ATG/ Msel CTG	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	
L26		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
L27		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L28		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1
L29		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1
L30		1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1
L31		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L32		1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0
L33		0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1
L34		1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
L35		1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
L36		1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0
L37		0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0
L38		1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0





## **ANEXO 1**

### **MATERIALES Y PROCEDIMIENTO**

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular del Instituto de Biotecnología (IBT), Universidad Nacional Agraria La Molina, situado en Av. La Molina s/n – La Molina, Ciudad de Lima.

#### **Material vegetal**

El material vegetal utilizado proviene del banco de germoplasma de “cañihua” del Centro de Investigación y Producción Camacani (CIP-C), Facultad de Ciencias Agrarias de la UNA Puno, distrito de Plateria, provincia y departamento de Puno.

En total se analizaron 26 accesiones de la colección de Cañihua.

#### **Material para la colecta**

- Bolsas plásticas
- Cooler
- Guantes de goma desechables
- Papel toalla
- Recipientes de plástico con tapa hermética y tecnopor.
- Cintas para rótulos.

#### **Material para la extracción de ADN**

##### **Material químico**

- Ácido acético glacial
- Agua destilada
- Alcohol isoamílico, (Merck)
- Bromuro de hexadeciltrimetil amonio (CTAB), (Sigma)

- Bomba de vacío
- $\beta$  – mercaptoetanol, (Sigma)
- Cloroformo, (Merck)
- Cloruro de sodio, (Merck)
- EDTA (ácido etilen diamino tetra – acético), (Sigma)
- Etanol absoluto 70° y 96°, (Merck)
- Isopropanol, (Merck)
- Nitrógeno líquido
- RNAase A, (Concert<sup>TM</sup> Invitrogen Life Technologies)
- SDS (Sodium dodecil sulfate)
- PVP (polyvinilpyrrolidone)
- Tris (Tris[hidroxymethyl] amino ethan), (Merck)

#### **Material de Laboratorio**

- Agitadores magnéticos
- Espátulas, pinzas, tijeras.
- Contenedor de Nitrógeno Líquido
- Gradillas y soportes para tubos.
- Guantes de vinilo, (Guardian<sup>TM</sup>)
- Juego completo de pipetores (BIO-RAD)
- Magnetos
- Matraces erlenmeyer, (Pirex®)
- Morteros de porcelana con su respectivo pistilo
- Puntas plásticas de 10, 200 y 1000  $\mu$ l de capacidad (Axygen)
- Probeta de 10, 100, 1000 ml. (pirex®)
- Racks polypropylne, (Axygen)

- Tubos para microcentrífuga de 0.6, 1.7 y 2 ml. (Eppendorf), (Axygen)
- Vasos de precipitado (pirex ®)

### **Equipos**

- Autoclave (Market Forge, modelo Sterlimatic)
- Balanza analítica, (Sartorius, modelo CP323S)
- Cámara de Baño maría, (Cimatec S.A)
- Cámara de Flujo laminar
- Centrifuga refrigerada (4°C) (Mikro 22R *Hettich Zentrifugen*)
- Congelador a - 20 °C (Electrolux)
- Congelador a - 70 °C (Electrolux)
- Estufa (Lab – line Instruments. Inc) modelo 3511-1
- Horno microondas, (Electrolux)
- Potenciómetro, (HANNA instruments pH 211)
- Refrigeradora, Electrolux
- Vórtex, (Scientific Industries, Vórtex – Genie1)

### **Material para la electroforesis**

#### **Material químico**

- Ácido Acético glacial, (Merck)
- Acrilamida, (BIO-RAD 99.9%)
- Agarosa, (Gibco BRL. Ultra pure)
- Agua destilada
- Azul de bromofenol (Sigma)
- Bind Silano adherente, Silane A 174 (Merck)
- Bromuro de Etidio, (Sigma)

- Bisacrilamida (N,N' – Methyllene- bis- acrymalide), (Sigma)
- Carbonato de Sodio, (Merck)
- Glicerol
- Formaldehído al 37%, (Sigma)
- Formamida, (Applichem)
- Fuente de poder, (BIO-RAD)
- Marcador de peso molecular, (Gene Ruler <sup>TM</sup> 100 bp DNA Ladder, Fermentas Life Sciences).
- Marcador de peso molecular, ADN del fago Lambda  $\lambda$  Pst I, (Gibco)
- Nitrato de plata, (Merck)
- Papel Tissue (Kimwipe®)
- Película fotográfica (Kodak, APC film)
- Persulfato de Amonio, (Sigma)
- Revelador y fijador de fotografía (Kodak GXB, 5X)
- TEMED (N,N,N'N'– Tetra – metil etilen di-amina) (Sigma)
- Tiosulfato de sodio, (Merck)
- SigmaCote, (Sigma - Aldrich)
- Urea, (Merck)

### **Materiales de Laboratorio**

- Cajas de dilución de 96 pocillos, 1 ml de capacidad c/u; (Axygen scientific)
- Gradillas y soportes para tubos
- Placas de vidrio para electroforesis vertical
- Racks polypropylne, (Axygen)
- Termómetro, (Fisherbrand ®)
- Vasos de precipitado, (Pyrex)

## **Equipos**

- Cámara de video, tarjeta capturadora de imágenes digital, (Digital Color CCD, AVC 591) y computadora
- Cámaras de electroforesis horizontal, (EC Minicell y BIO-RAD SubCell – 192)
- Cámara de electroforesis vertical, Sequi – Gen® GT Nucleic Acid Electrophoresis Cell, (BIO-RAD)
- Cámara digital, (AVC 591 Digital Color CCD)
- Expositor de luz UV Transiluminador 2000, (BIO-RAD)
- Escáner, (Epson Perfection 1260)
- Horno Microondas, (Electrolux)
- Impresora Láser, (Seros Phaser 3120)
- Purificador de agua, (Millipore, Simplicity 185)
- Refrigeradora, (Electrolux)
- Shaker, (Modelo C10 Platform, New Brunswick Scientific)

## **Material para PCR**

### **Material químico**

- Aceite mineral, (Sigma)
- Agua libre de nucleasas, (Sigma)
- Alcohol 96%
- Cloruro de Magnesio 1 M solución, (Sigma Lote 99H8925)
- Desoxinucleótidos, (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (Fermentas Lote: 0354)
- EDTA, (Sigma)
- Enzima T<sub>4</sub> ADN ligasa
- Enzimas de restricción:



- *EcoRI*
- *MseI*
- Enzima Taq ADN polimerasa y solución tampón de almacenamiento.
- Iniciadores para *Eco RI* y *Mse I*
- Kit de AFLP® Core Reagent Kit (INVITROGEN)
- Solución tampón 10X PCR Buffer II (INVITROGEN)
- Xilencianol (Sigma)

### **Material de Laboratorio**

- Micropipetas regulables de 0.5–10µl, 5–20µl, 100–1000µl (uso exclusivo para PCR), (BIO-RAD)
- Placas de policarbonato PCR de 96 pocillos, (Axygen)
- Puntas para micropipeta 0.5-10µl, 20-100 µl, 100-1000 µl, (Axygen)
- Tapa de placas PCR de 96 pocillos, (Axygen)
- Tubos en tiras y tapas en tiras para PCR, (Axygen)
- Tubos Strips 0.2 ml para PCR, (Axygen)

### **Equipos**

- Microcentrífuga para tubos de 1.7 ml, de un máximo hasta 10000 rpm, (Denver Instruments co.)
- Termociclador, (GeneAmp ® PCR System 9700)

### **Software**

- NTSys -pc versión 2.00 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, Nueva York, EE. UU).
- Arlequín 3.01 (Excoffier, 2005)
- Paint Shop Pro 5.01 (Jasc Corporate, MN, USA)

## ANEXO 2

### PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN PARA (*Chenopodium pallidicaule*

Aellen) “CAÑIHUA”

#### Reactivos y Soluciones

1. Nitrógeno líquido pre-enfriado a una Temperatura -180°C
2. CTAB Buffer de Extracción 2% (CTAB 2X)

Bromuro de hexadeciltrimetil amonio	2.0g	20.0g	2.0%
(CTAB)			
Cloruro de sodio (NaCl) 1M	8.18g	81.81g	1.4M
EDTA 0.5M pH 8.0	4.0ml	40.0ml	20mM
Tris – HCl 1M pH 8.0	10.0ml	100.0ml	100mM
Polivinil – pirrolidona (PVP)	1.0g	10.0g	1.0%
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	100ml	1L	Concentración final

NOTA: El CTAB y PVP se adicionan de a pocos, para evitar la formación de grumos, cuando la solución está caliente (80°C) y luego se adicionan los demás componentes. Esperar a que se disuelva primero el CTAB y luego adicionar el PVP. Evitar que la solución alcance punto de ebullición. Esterilizar en auto clave inmediatamente después de haber disuelto todos los componentes. Tener en cuenta que cada componente desplaza un volumen de agua.

3. Cloroformo: alcohol isoamílico en proporción 24:1 respectivamente
4. CTAB Buffer de Extracción 10% (CTAB 10X)

Bromuro de	5.0g	10.0g	10%
Cetiltrimetilamino (CTAB)			
Cloruro de Sodio (NaCl) 1M	2.05g	4.09g	0.7M
EDTA 0.5M pH 8.0	2.0ml	4.0ml	20mM
Tris – HCl 1M pH 8.0	5.0ml	10.0ml	100mM
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	50.0ml	100.0ml	Concentración final

NOTA: El CTAB se adiciona cuando la solución está caliente (80°C) y luego de haberse agregado todos los demás componentes. Ir agregando de poco, para evitar la formación de grumos. Evitar que la solución alcance punto de ebullición. Esterilizar en auto clave inmediatamente después de haber disuelto todos los componentes.

5. Isopropanol frio.

6. Etanol de 96% y 70%

7. T<sub>10</sub> E<sub>1</sub>

Tris-HCl 1M pH 8.0	4.0ml	10.0ml	10mM
EDTA 0.5M pH 8.0	0.8ml	2.0ml	1mM
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	400ml	1L	Concentración final

NOTA: Esterilizar en autoclave

8. ARNasa A (Invitrogen)

### Método Experimental

1. Tomar aproximadamente 100mg de hojas de cañihua, colocarlas en un mortero pre-enfriado con nitrógeno líquido, agregar nitrógeno sobre el tejido e iniciar la trituración con el pilón hasta obtener un polvo fino.

Nota: en caso de no disponer de nitrógeno líquido, colocar el tejido en un mortero y adicionar 1000µl de buffer CTAB 2X y 5 µl de β -Mercaptoetanol, macerar, triturar y luego transferir a un tubo para microcentrifuga de 1.5ml (solo llenar hasta la mitad).

2. Repartir el polvo fino en un tubo de 1.5ml y agregar inmediatamente 700µl de Tampón de extracción CTAB 2X Y 2µl de β-Mercaptoetanol, a cada muestra.
3. Mezclar las muestras e incubarlas en baño maría a 65 °C por 30 minutos al baño maría, agitándolas suavemente cada 10 minutos.
4. Dejar enfriar la mezcla a temperatura ambiente por 2 minutos.
5. Agregar 700µl de Cloformo: alcohol isoamilico (24:1), a cada muestra y mezclar hasta obtener una solución homogénea.
6. Centrifugar la solución por 10 minutos a 14000 revoluciones por minuto (rpm).
7. Transferir cuidadosamente el sobrenadante a un nuevo tubo teniendo cuidado de no tocar la interfase. Descartar la fase inferior remanente.
8. Adicionar 50µl de buffer CTAB 10X y agitar con cuidado hasta obtener una solución uniforme.
9. Repetir los pasos 5,6 y 7.
10. Agregar a cada tubo un volumen igual al existente de Isopropanol frío (entre 400 y 500 µl) y mezclar por inversión suavemente.  
  
En caso de no observar el pellet, colocar la muestra a -20C por 20 minutos y centrifugar por 3 minutos a 14000rpm.
11. Eliminar el sobre nadante sin perder el pellet y realizar dos lavados con Etanol de 95% y 70%, respectivamente.

12. Secar el precipitado manteniendo abiertos los tubos durante toda la noche o mediante una bomba de vacío por 20 minutos.
13. Resuspender el precipitado en 50  $\mu$ l de buffer TE.
14. Agregar 2  $\mu$ l de ARNasa (10mg/ml), agitar suavemente e incubar por 30 minutos a 37 °C
15. Almacenar las muestras a -20°C

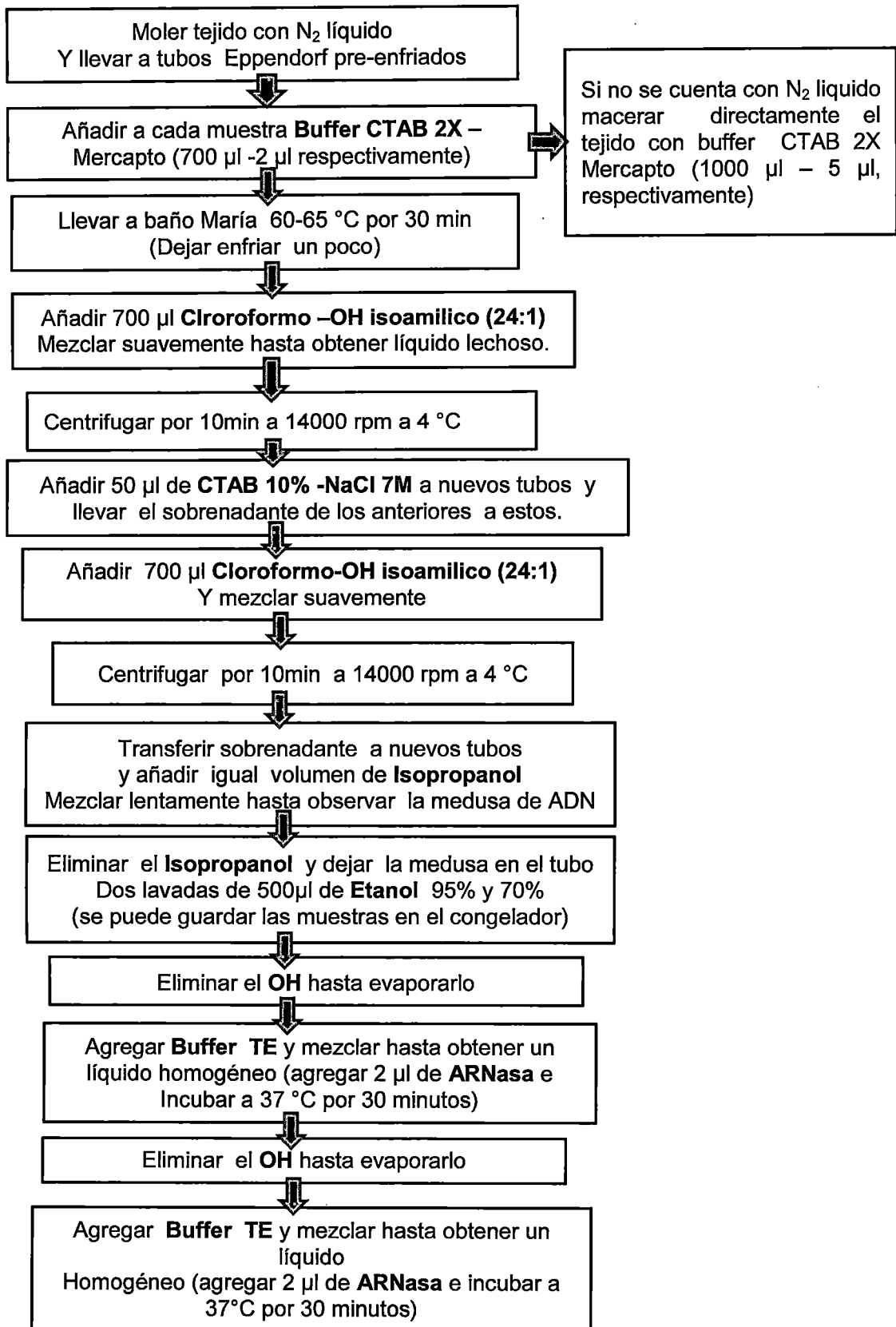


Figura 7. Extracción de ADN modificado para (*Chenopodium palidicaule* Aellen)

“Cañihua”

### ANEXO 3

## ANÁLISIS DE CALIDAD Y CUANTIFICACIÓN DE ADN

### Corrida Electroforética

#### Reactivos y Soluciones

1. Muestras de ADN a verificar. Se tomó 1  $\mu$ l de muestra y se mezcla con 9  $\mu$ l de Tampón de corrida para agarosa (volumen total: 10ml).
2. Tampón de carga para geles de agarosa (10X).

Azul de Bromofenol	0.25 g
0.25%	
Xilencianol 0.25%	0.25 g
Sucrosa 40% p/v	40 g
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	100 ml

Nota: Iniciar con 10ml de H<sub>2</sub>O (d) milli Q

3. Buffer de corrida TBE 10X

Tris Base*	108.0 g	216.0 g	432.0 g	890 mM
Ácido Bórico	55.0 g	110.0 g	220.0 g	890 mM
EDTA 0.5 M pH	40.0 g	80.0 ml	160 ml	20 mM
8.0	1 L	2 L	4 L	Concentración
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.				final

#### 4. Agarosa

Componentes	Molde de 30 ml	Molde de 60 ml	Molde de 250 ml
TBE 1X	30.0 ml	60.0 ml	250 ml
Agarosa	0.3 g	0.6 g	2.5 g
Bromuro de Etidio (10mg/ml)	0.3 $\mu$ l	0.6 $\mu$ l	2.5 $\mu$ l

Nota: Correr con Buffer TBE 1X (cámara horizontal) en volumen apropiados.

#### 5. Marcador de peso

##### Procedimiento

1. Llevar el Buffer TBE a 1X y colocar en la cámara electroforética horizontal
2. Introducir el gel de agarosa (mezclar la agarosa en TBE 1X y llevar al microondas hasta obtener una solución clara y transparente. Una vez que la temperatura haya disminuido, sin llegar a gelificar, añadir bromuro de etidio en concentración de 10mg/ml) ya gelificado en la cámara electroforética.
3. Cargar los 10  $\mu$ l de las muestras previamente preparadas.
4. Cargar en los extremos y/o medio del gel 10  $\mu$ l de marcador de peso molecular
5. Correr por aproximadamente 1 hora y 30 minutos a un voltaje de 80 voltios (73 miliamperios)
6. Comparar la intensidad de la banda de las muestras con el marcador de peso. En el marcador lambda cortado con PST I, la primera banda es de 280ng/ $\mu$ l, así es fácil estimar la concentración de ADN de cada muestra en nanogramos por microlitro (ng/ $\mu$ l).



## ANEXO 4

### POLIMORFISMO EN LA LONGITUD DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS (AFLP)

#### Protocolo

Consta de 4 pasos:

- Digestión de ADN genómico
- Unión de los adaptadores específicos
- Pre- amplificación de los fragmentos de ADN digeridos y ligados
- Amplificación selectiva de los fragmentos pre-amplificados

Los marcadores AFLP fueron detectados siguiendo el procedimiento descrito en el Manual AFLP Analysis System I versión B (Invitrogen), con algunas modificaciones, usando el método no radioactivo. La metodología se describe a continuación.

Digestión	1	10	49	97
	reacción	reacciones	reacciones	reacciones
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Buffer de reacción 5X	2.5	25	122.5	242.5
EcoRI/MseI	1.0	10	49.0	97.0
Total	3.5	35	171.5	339.5

3.5  $\mu$ l digestión + 9 DNA (50 ng/ $\mu$ l)

Mezclar o centrifugar la mezcla de digestión por algunos segundos

Llevar a incubación a 37 °C por 2 horas y luego, a 70 °C por 15 minutos. Pasar a frío.

Ligación	1	10	49	97
	reacción	reacciones	reacciones	reacciones
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Solución de ligación del adaptador	12.0	120.0	588.0	1164.0
Ligasa ADN T <sub>4</sub>	0.5	5.0	24.5	48.5
<b>Total</b>	<b>12.5</b>	<b>125</b>	<b>617</b>	<b>1212.5</b>

12.5  $\mu$ l Ligación + 12.5 DNA digerido

Mezclar o centrifugar la mezcla de ligación por algunos segundos.

Llevar a incubación a 20 °C por 2 horas

Realizar una dilución 1:10 usando 2 $\mu$ l de ADN digerido ligado con 18  $\mu$ l de buffer TE (incluido en el kit). Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C.

Pre-amplificación	1	10	49	97
	reacción	reacciones	reacciones	reacciones
	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)	( $\mu$ l)
Mezcla de Pre- amplificación	10.00	100.0	490.00	970.00
Buffer PCR 10X para AFLP	1.25	12.5	61.25	121.25
DNA Taq polimerasa (5U/ $\mu$ l)	0.10	1.0	4.90	9.70
<b>Total</b>	<b>11.35</b>	<b>113.5</b>	<b>556.15</b>	<b>1100.95</b>

11.35  $\mu$ l Pre- amplificación + 1.25 DNA digerido/ligado/diluido

Mezclar o centrifugar la mezcla de Pre-amplificación por algunos segundos.

Añadir a cada muestra 1 gota de aceite mineral.

Amplificar de acuerdo a las siguientes condiciones.

	94 °C por 30 segundos
20 ciclos	56 °C por 60 segundos
	72 °C por 60 segundos

Realizar una dilución 1:5 del ADN pre-amplificado con el buffer TE, (usando 10 µl de ADN pre-amplificado con 40 µl de buffer TE, respectivamente). Las muestras pueden ser almacenadas a -20 °C.

Amplificación selectiva	1	10	49	97
	reacción	reacciones	reacciones	reacciones
	(µl)	(µl)	(µl)	(µl)
Agua libre de nucleasas	3.46	34.6	169.54	335.62
Primer EcoR I	0.09	0.9	4.41	8.73
Primer Mse I	2.25	22.5	110.25	218.25
Buffer PCR 10X para AFLP	1.00	10.0	49.00	97.00
DNA Taq polimerasa (5U/µl)	0.20	2.0	9.80	19.40
Total	7.00	70.0	343.00	679.00

7 µl Amplificación Selectiva + 3 µl DNA pre- amplificado/diluido (1:5)

Mezclar o centrifugar la mezcla de pre-amplificación por algunos segundos.

Añadir a cada muestra 1 gota de aceite mineral.

Amplificar de acuerdo a las siguientes condiciones.

	94 °C por 30 segundos
1 ciclo	65 °C por 30 segundos
	72 °C por 60 segundos
Bajar la temperatura de alineamiento cada ciclo en 0.7 °C por 12 ciclos, manteniendo las demás condiciones constantes, luego:	
	94 °C por 30 segundos
23 ciclos	56 °C por 30 segundos
	72 °C por 60 segundos

Añadir a cada muestra 5µl de Tampón de carga para geles de poliacrilamida.

Las muestras pueden ser almacenadas a – 20 °C.

Analizar los productos amplificados, denaturando las muestras a 95 °C por 5 minutos, cargar 5 µl de las mismas, en gel de poliacrilamida y correr las muestras por electroforesis.

La tinción, se realiza con Nitrato de Plata de acuerdo al protocolo establecido.

## Iniciadores AFLP – Eco RI y Mse I

Iniciadores Eco RI con tres bases selectivas						
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/ACT3'	E38
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/ATG3'	E45
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/ACA3'	E35
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/AGG3'	E41
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/AAC3'	E32
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C/AAG3'	E33
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C / AG3'	E13
5'GAC	TGC	GTA	CCA	ATT	C / AC3'	E12

Iniciadores Mse I con tres bases selectivas						
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A/AGG3'	M41
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A/AAC3'	M32
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A/AGC3'	M40
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A/ATG3'	M45
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A/ACA3'	M35
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A / ACG3'	M37
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A / CTA3'	M59
5'GAT	GAG	TCC	TGA	GTA	A / CTG3'	M61

## Relación de Combinaciones de Iniciadores AFLP evaluados

---

### Combinaciones de Iniciadores AFLP Eco RI/Mse I

---

*EcoRI ATG/MseI CTG*

*EcoRI AAG/MseI AGC*

*EcoRI ACT/MseI AGG*

*EcoRI ACA/MseI ATG*

*EcoRI ATG/MseI AGG*

*EcoRI AGG/MseI ACA*

*EcoRI AC/MseI AAC*

*EcoRI AG/MseI AGG*

*EcoRI ATG/MseI CTA*

*EcoRI AC/MseI CTA*

*EcoRI AC/MseI ACG*

*EcoRI AGG/MseI ATG*

*EcoRI AG/MseI AAC*

*EcoRI AAC/MseI CTG*

*EcoRI AG/MseI AGC*

*EcoRI AAG/MseI CTG*

---

## ANEXO 5

### PREPARACIÓN DE GELES DE POLIACRILAMIDA

Para empezar a trabajar, las placas de vidrio deben estar sumamente limpias con agua y etanol.

Preparación de la placa de vidrio pequeña:

1. Preparar la solución adherente agregando 5  $\mu$ l de bind silano (solución adherente) y 5  $\mu$ l de ácido acético glacial a 1.5 ml de etanol.
2. Frotar la placa limpia con papel tissue humedecido con 1.5 ml de la solución adherente. Cubrir completamente la placa.
3. Dejar secar por 45 minutos.

Preparación de la placa de vidrio grande

4. Cambiar de guantes antes de manipular la placa de vidrio grande, para evitar contaminación con la solución adherente.
5. Flotar la placa con papel tissue saturado con la solución repelente para vidrio (Sigma Cote).
6. Dejar secar por 45 minutos.

Preparación del gel de secuenciamiento:

Ensamblar las placas de vidrio antes de verter el gel de poliacrilamida. Para ello, se debe tener especial cuidado con problemas de filtración, presión uniforme de los ganchos y peines adecuados.

7. Colocar los espaciadores laterales sobre la placa de vidrio grande y sobre ella colocar la placa de vidrio pequeña, de modo que los lados tratados con la solución adherente y repelente queden del mismo lado.

8. Entre las dos placas colocar el espaciador inferior, evitando dejar rendijas por donde puede filtrarse la solución de poliacrilamida.
9. Asegurar los extremos inferiores y laterales con ganchos metálicos. De ser necesario, asegurar los extremos con agarosa diluida para sellar.
10. Medir 60 ml de solución de poliacrilamida al 6% y agregarle 34  $\mu$ l de TEMED y 340  $\mu$ l de persulfato de amonio al 10%. Agitar suavemente. Para verter la solución dentro de las placas hay que levantarlas ligeramente por una de las esquinas superiores, de modo que el sistema quede inclinado. Verter la solución lentamente con cuidado de no formar burbujas. Una vez que la solución alcanza el otro extremo (fondo), baja lentamente y terminar de llenar.
11. Colocar el peine, entre las dos placas de vidrio. Dejar polimerizar por un mínimo de 2 horas.

#### Instalación y Pre-electroforesis del gel

12. Una vez polimerizado el gel, retirar los ganchos metálicos, el separador inferior y los excesos de poliacrilamida.
13. Colocar el gel armado en la cámara de electroforesis vertical, con la placa pequeña mirando hacia el interior de la cámara. Ajustar con los sujetadores de la cámara y verter los buffers de corrida: TBE 1X en la parte inferior y TBE 0.5X en la parte superior.
14. Con ayuda de una jeringa, retirar las burbujas que se conformaron en la parte superior e inferior de las placas.
15. Pre-correr el gel a 1600 V durante 30 minutos.
16. Antes de cargar las muestras, volver a limpiar la parte superior e inferior del gel.



### Solución Stock para geles de poliacrilamida al 6%

TBE 10X	50.0ml	200.0 ml	50.0%
Bis – acrilamida	3.0 g	12.0 g	0.3 %
Acrilamida	60.0 g	240.0g	6.0%
Urea	420.0 g	1680.0 g	7M
H <sub>2</sub> O (d) milli Q	1L	4L	Concentración
c.s.p.			final

Nota: la preparación del stock se realiza con un 60% de H<sub>2</sub>O (d) milli Q del volumen final deseado. Ir agregando los componentes en el orden indicado.

### Gel de poliacrilamida 6%

Componentes	geles AFLP	geles ISSR
Solución Stock acrilamida 6%	90.0 ml	30 ml
TEMED (Tetramethylethylene diamine)	55.0 µl	20.0 µl
Persulfato de Amonio 10%	550.0 µl	220.0 µl

Nota: las cantidades pueden variar dependiendo de lo rápido que se vaya a utilizar el gel.

### Solución adherente (BIND)

Componentes	Volumen
Etanol	3.0 ml
Silane	7.0 µl
Ácido acético	7.0 µl

Stock de colorante de carga para geles de poliacrilamida (Dye)

Xilencianol	50.0 mg	2.5 g
Azul de bromofenol	50.0 mg	2.5 g
H <sub>2</sub> O (d) milli Q c.s.p.	1.0 mg	50.0 ml

Tampón de carga para geles de poliacrilamida

Componentes	Volumen
Formamida	48.0 ml
EDTA 0.2 M	2.5 ml
Dye	500.0 µl

Nota: el volumen final supera los 50 ml. Preparar en tubos cónicos de 50 ml (Falcon) y dispensar en tubos de 2 ml.

Buffer de Corrida TBE 0.5X para Cámaras de Electroforesis vertical (arriba)

Componentes	1 cámara (ml)	2 cámaras (ml)	3 cámaras (ml)	4 cámaras (ml)
TBE 10X	35.0	70.0	105.0	140.0
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	700.0	1400.0	2050.0	2700.0

Buffer de corrida TBE 1X para Cámaras de Electroforesis vertical (abajo)

Componentes	1 cámara (ml)	2 cámaras (ml)	3 cámaras (ml)	4 cámaras (ml)
TBE 10X	45.0	90.0	135.0	180.0
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.	900.0	1800.0	3510.0	5220.0

## ANEXO 6

### DETECCIÓN DE MARCADORES AFLP CON TINCIÓN DE NITRATO DE PLATA (PROMEGA CORPORATION, 2000; CIP, 2000)

Procedimiento:

1. Preparar las soluciones:

- a. Solución de Fijación/de finalización de la reacción: Adicionar 100 ml de ácido acético glacial a 900ml de agua destilada.
- b. Solución de Tinción: Disolver 1 g de nitrato de plata ( $\text{Ag NO}_3$ ) en 1L de agua destilada y añadir 1.5 ml de formaldehído al 37%
- c. Solución de Revelado: Disolver 24 g de carbonato de sodio ( $\text{Na CO}_3$ ) en 800 ml de agua destilada. Instantes antes de ser usado, adicionar 1200  $\mu\text{l}$  de Formaldehído al 37% y 18  $\mu\text{l}$  de Tiosulfato de Sodio (100 mg/ml).

Todas las soluciones empleadas deben estar a 4°C.

2. Separación de las placas de vidrio: Una vez finalizada la electroforesis, retirar las placas de vidrio de la cámara y con ayuda de una espátula separar cuidadosamente las placas. El gel debe permanecer adherido a la placa pequeña.
3. Fijación del gel: Colocar la placa pequeña de vidrio en la bandeja con la solución fijadora y agitar por 20, 30 y 40 minutos, para primer, segundo y tercer uso, respectivamente. Guardar esta misma solución, para utilizarla para detener la reacción.
4. Lavados: Después de terminada la fijación lavar dos veces con agua destilada el vidrio por espacio de 3 a 4 minutos.

5. Tinción del gel: Llevar el gel a solución de Nitrato de Plata. Teñir el gel por espacio de 30, 45 y 60 minutos, para primer, segundo y tercer uso, respectivamente. Lavar el gel en agua helada por 4 a 10 segundos.
6. Revelado del gel:
  - a. Completar la preparación de la solución reveladora añadiendo el Formaldehído y Tiosulfato de sodio. Colocar esta solución en una bandeja de fondo claro, para poder distinguirla aparición de bandas.
  - b. Transferir el vidrio (después del lavado con agua helada) a la solución reveladora.
  - c. Agitar bien el vidrio en la solución de carbonato de sodio hasta que el patrón de bandas sea visible.
7. Fijación del gel: Para detener el revelado y fijar la tinción, colocar el vidrio en la solución de ácido acético al 10% por espacio de algunos minutos.
8. Enjuagar el gel en agua destilada y posteriormente con agua de caño repetidas veces, para luego dejar secar a temperatura ambiente.

## ANEXO 7

### PREPARACIÓN DE OTROS REACTIVOS UTILIZADOS

#### EDTA 0.5 pH 8.0

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA)	186.1 g
Hidróxido de sodio (NaOH)	50- 120 pastillas aproximadamente
H <sub>2</sub> O (d) c.s.p.*	100ml

Nota: Empezar a disolver en 800 ml de H<sub>2</sub>O (d) con las pastillas de NaOH, agregar el EDTA y llevar a pH 8.0, para enrasar a 1000ml. Volver a medir el pH.

Esterilizar en autoclave.

\*c.s.p.: cantidad suficiente para...

#### Tris-HCL 1M pH 8.0

Tris Base*	Disolver con H <sub>2</sub> O (d)	Enrasar hasta
g	ml	ml
121.1	800	1000
96.8	650	800
60.5	400	500

Nota: Luego de enrasar al volumen deseado se vuelve a medir el pH y se esteriliza en autoclave.

\*sinónimos: Trizma base, Tris (hydroxymethyl) aminomethane.